

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis

Luciana Gomes Fonseca Almeida

**ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO UTILIZANDO SORGO BIOMASSA (*Sorghum
bicolor*)**

Diamantina

2019

Luciana Gomes Fonseca Almeida

**ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO UTILIZANDO SORGO BIOMASSA (*Sorghum
bicolor*)**

Trabalho apresentado ao programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis da Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri, como parte dos requisitos para obtenção do Título em Ciência e Tecnologia dos Biocombustíveis.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Sylvio Vieira Costa
Coorientadores: Prof. Dr. Alexandre Soares dos Santos, Dr. Rafael Augusto da Costa Parrella.

**Diamantina
2019**

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A447e Almeida, Luciana Gomes Fonsêca de.
Etanol de segunda geração utilizando sorgo biomassa (*Sorghum bicolor*)
/ Luciana Gomes Fonsêca de Almeida. – Diamantina, 2019.
113 p. : il.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Sylvio Vieira Costa.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis) -
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

I. Etanol celulósico 2. Lignocelulose 3. Parede celular 4. Biocombustíveis 5.
Cultura bioenergética 6. Gegenótipos de sorgo. I. Costa, Alexandre Sylvio Vieira. II.
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Programa de
Pós-Graduação em Biocombustíveis. III. Título.

CDD 662.88

LUCIANA GOMES FONSÊCA DE ALMEIDA

**ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO UTILIZANDO SORGO BIOMASSA
(*Sorghum bicolor*)**

Tese apresentada ao DOUTORADO
EM BIOCOMBUSTÍVEIS, nível de
DOUTORADO como parte dos
requisitos para obtenção do título de
DOUTORA EM BIOCOMBUSTÍVEIS

Orientador (a): Prof. Dr. Alexandre
Sylvio Vieira Da Costa

Co-orientador: Rafael Augusto da
Costa Parrella

Data da aprovação : 31/05/2019



Dr. RAFAEL AUGUSTO DA COSTA PARRELLA - EMBRAPA



Prof. Dr. MARCELO LUIZ DE LAJA - UFVJM



Dr.ª FLAVIA CAMPOS VIEIRA - IEF



Prof. Dr. EMERSON DELANO LOPES - IFNMG



Dr.ª MARIA LUCIA FERREIRA SIMEONE - EMBRAPA



Prof. Dr.ª MARCIA REGINA DA COSTA - UFVJM

DIAMANTINA

À minha amada Mãe...

Ao meu Avô, Vovô Zé, eterno orgulhoso por nossas conquistas...

Ao meu irmão, exemplo de generosidade!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos concedidas!

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) e ao Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis, pela oportunidade de cursar o doutorado.

Aos Professores Alexandre Sylvio Vieira da Costa e Alexandre Soares dos Santos, pelas orientações.

Ao Laboratório de Bioprocessos e Biotransformação da UFVJM.

Aos Pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo, Rafael Parrella e Maria Lúcia Simeone, pelas orientações, amizade e comprometimento com o trabalho desenvolvido.

À Embrapa Milho e Sorgo, pela disponibilidade do material genético e realização das análises laboratoriais complementares e essenciais a esse trabalho.

À equipe da Fazenda Rio Manso da UFVJM, em especial ao Eng. Agrônomo Paulo e aos colaboradores de campo.

Aos departamentos de Ciências Agrárias e Ciências Florestais da UFVJM, pela atenção em todos os momentos solicitados e pela disponibilidade de equipamentos.

Ao departamento de Química da UFVJM, em especial ao colaborador Teles, pela disponibilidade da análise de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Ao Laboratório de Caracterização e Microscopia DEMAT do CEFET/MG, em especial aos professores Marcelo Dumont e Paulo Renato, pela atenção e parceria disponibilizada na realização das análises DRX.

Ao meu primo Diogo Augusto Fonseca Gonçalves, por intermediar as análises realizadas no CEFET/MG, e principalmente pela paciência e ajuda no refinamento dos resultados de DRX e TG.

Ao Mestrando Pedro César de Oliveira Ribeiro, pela amizade e auxílio nas análises estatísticas.

Aos amigos e colegas de curso, em especial a Gabriela Maria Barbosa, Philipe Luan Brito, Cíntia Gonçalves Guimarães e Caroline Salezzi Bonfá, por toda ajuda disponibilizada nos trabalhos de campo e laboratório, e principalmente pela amizade e convivência diária que tornaram esse doutorado mais leve e alegre.

À amiga Sandra Damasceno, pelo acolhimento e palavras de incentivo e apoio.

A todos os professores e funcionários da Pós-Graduação da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

À minha família, por ser o suporte da minha vida!

À CAPES, pela bolsa de estudos.

A todos que ajudaram de alguma maneira para que esse trabalho se concretizasse, os meus sinceros agradecimentos!!!

RESUMO

Em um contexto de mudanças climáticas, alinhado com a necessidade de reduzir as emissões de gases de efeito estufa, os biocombustíveis integram a diversificação da matriz de transporte, contribuindo para o suprimento de energia de forma segura, acessível e ambientalmente responsável. Apesar de o Brasil ser o segundo maior produtor global de etanol, ainda requer a diversificação de culturas bioenergéticas. Além disso, a composição lignocelulósica da biomassa e a capacidade de desconstrução da parede celular vegetal, também são extremamente importantes para indicar uma cultura potencial para o mercado de bioenergia. Esta composição físico-química pode ser diferenciada entre espécies, manejo cultural e até mesmo em diferentes partes da mesma planta. Nesse cenário, o sorgo biomassa (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) apresenta-se como potencial matéria prima para a produção do etanol de segunda geração. O sorgo é uma planta C4, de dias curtos e com altas taxas fotossintéticas, além de ter a vantagem de adaptação a diversos ambientes, permitindo o desenvolvimento e expansão da cultura em regiões de cultivo com distribuição irregular de chuvas. Dessa forma, objetivou-se com este estudo identificar genótipos de sorgo biomassa com potencial agrônomo e composição lignocelulósica favorável ao desenvolvimento do etanol de segunda geração. Foram cultivados cinco híbridos de sorgo biomassa, nos municípios de Sete Lagoas e Couto de Magalhães de Minas, nas safras 2015/2016 e 2016/2017. A composição lignocelulósica da biomassa *in natura* de cada material, e após os pré-tratamentos, foram determinadas para verificação futuras de melhores rendimentos de etanol. O pré-tratamento ácido foi realizado com ácido sulfúrico (H₂SO₄), enquanto para o pré-tratamento alcalino foi utilizado solução de hidróxido de sódio (NaOH). Dentre os materiais avaliados, dois híbridos mutantes de sorgo biomassa de nervura marrom “*bmr*” foram testados comparativamente a três híbridos de sorgo biomassa convencionais. Entre os caracteres agrônômicos, constatou-se diferença na produtividade, sendo o híbrido BRS716 o mais produtivo, com produção de massa verde (PMV) de 98,41 t ha⁻¹ e produção de massa seca (PMS) de 33 t ha⁻¹. O híbrido de sorgo biomassa de nervura marrom *bmr* 2015B002 também apresentou valores considerados altos, com um PMV de 81,03 t ha⁻¹. Em relação à composição lignocelulósica da biomassa *in natura*, os híbridos de nervura marrom *bmr* 2015B002 e 2015B003 se destacaram, apresentando teores de lignina significativamente menores (4,63%) em relação aos híbridos convencionais (7,15%). Verificou-se que os pré-tratamentos foram eficientes na remoção de lignina, constatando teores próximo de zero para os genótipos 2015B002 e 2015B003. A lignina é um composto polifenólico que interfere de maneira negativa no processo de sacarificação, uma vez que dificulta a ação das enzimas ao

complexo celulósico. Os resultados demonstraram que o tratamento ácido seguido por base apresentou o melhor rendimento após a hidrólise enzimática, corroborado pelas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Análise de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Análise de índice de cristalinidade (DRX) e Análise Térmica (TG), que demonstraram a modificação estrutural desejável. Os melhores rendimentos de hidrólise foram obtidos a partir dos materiais pré-tratados, sendo o tratamento ácido seguido de base o que obteve os melhores resultados. Os genótipos avaliados nos dois ambientes apresentaram desempenho semelhante, podendo ser recomendado para as duas regiões. Não houve interação entre híbridos e ambiente, para todos os caracteres avaliados. A produção de bioetanol de segunda geração para os híbridos avaliados variou entre 6.612 a 11.838 litros por hectare, por ciclo de 180 dias. O sorgo biomassa *bmr* 201556B002 apresentou melhor rendimento de hidrólise, para os dois tipos de sacarificação utilizados, quando comparados aos genótipos convencionais.

Palavras chave: Etanol celulósico, lignocelulose, parede celular, biocombustíveis, cultura bioenergética, genótipos de sorgo.

ABSTRACT

In a context of climate change, in line with the need to reduce greenhouse gas emissions, biofuels integrate the diversification of the transport matrix, contributing to secure, affordable and environmentally responsible energy supply. Brazil is the second largest global producer of ethanol, but it needs diversification of bioenergy crops to boost agricultural production and technological development. The lignocellulosic composition of the biomass and the deconstruction capacity of the plant cell wall, are extremely important to indicate a culture as a potential biomass supply chain for bioenergy market. This physicochemical composition can be differentiated between species, cultural management and even in different parts of the same plant. *Sorghum bicolor* (L.) (Moench), which stands out for its dry matter yield per hectare, has been considered as potential raw material for biofuels. Sorghum is a C4 plant, photoperiod sensitive; these are characteristics of short-day plants with high photosynthetic rates. Sorghum genotypes were evaluated for agronomic potential and chemical composition favorable to the production of cellulosic ethanol. Five biomass sorghum hybrids were grown, in the city Sete Lagoas and Couto de Magalhães de Minas, in the agricultural year 2015/2016 and 2016/2017. The lignocellulosic composition of the raw biomass of each genotype, and after acid and alkaline pretreatments was determined for future investigations of improved ethanol yields. Among the evaluated materials, two hybrid brown midrib (*bmr*) sorghum biomass were tested and compared to three conventional sorghum biomass hybrids. Among the agronomic characters, there was a difference in productivity. The hybrid BRS716 being the most productive, with a fresh biomass yield (FBY) of 98,41 t ha⁻¹ and dry biomass yield (DBY) of 33 t ha⁻¹. The hybrid sorghum brown midrib *bmr* 2015B002 also presented values considered high, with FBY of 81,03 t ha⁻¹. The lignocellulosic composition of the biomass of the *bmr* hybrid 2015B002 and 2015B003 stood out, presenting significantly lower lignin contents (4.63%) than the conventional hybrids (7.15%). The results showed that the acid treatment followed by the alkaline treatment showed the best performance after the enzymatic hydrolysis, supported by the Scanning Electron Microscopy (SEM), Fourier Transform Infrared Analysis (FTIR), Thermal analysis (TG) and crystallinity index analysis, that demonstrated the desired structural modification. Cellulosic ethanol production for the evaluated hybrids ranged from 6,612 to 11,838 liters per hectare per cycle of 180 days. Biomass sorghum *bmr* 201556B002 presented better hydrolysis yield for the two types of saccharification used when compared to conventional genotypes.

Key words: Cellulosic ethanol, lignocellulosic, cell wall, biofuels, bioenergetic crop, sorghum genotypes.

LISTRA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Produção de etanol no Brasil em barris equivalentes de petróleo, no período de 2012 a 2019.....	27
Figura 2 - Produção brasileira de etanol (m ³) entre as safras 2013/2014 e 2018/2019. Valores atualizados em 23/04/2019.	28
Figura 3 - Fluxograma da produção de etanol a partir de diferentes rotas.	30
Figura 4 - Em azul está representado a celulose, em verde as hemiceluloses e em amarelo a pectina.	33
Figura 5 - Esquema ilustrativo da estrutura da parede celular vegetal.	34
Figura 6 - Moléculas de glicose unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo β -1,4.....	35
Figura 7 - Estrutura típica da hemicelulose mostrando as diferentes ligações e compostos encontrados nas ramificações	36
Figura 8 - Monômeros precursores da lignina (a) álcool <i>trans-para</i> -cumárico, (b) álcool <i>trans-conefírico</i> e (c) álcool <i>trans-sinapílico</i>	37
Figura 9 - Alterações do complexo lignocelulósico após pré-tratamento.	38
Figura 10 - Esquema geral dos principais inibidores gerados a partir do material lignocelulósico durante o pré-tratamento ácido.	42
Figura 11 - Ação das celulasas sobre a molécula de celulose.	44
Figura 12 - Representação esquemática da produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica.	46
Figura 13 – Croqui experimental de campo.	54
Figura 14- Colheita e processamento do sorgo biomassa na safra 2015/2016.	56
Figura 15 – Cultivo e desenvolvimento do sorgo biomassa na safra 2015/2016.	67
Figura 16 - Composição (%) lignocelulósica das biomassas de sorgo.	74
Figura 17 - Biomassa de sorgo após o tratamento com NaOH.	75
Figura 18 - Biomassa de sorgo <i>in natura</i> e após os tratamentos.	75
Figura 19 - (a) MEV 1000x híbrido <i>bmr</i>	76
Figura 20 - (a) MEV 1000x híbrido convencional.	76
Figura 21 - Espectros de FTIR do sorgo biomassa <i>in natura</i> e pré-tratados, na região do comprimento de onda de 4.000 a 800 cm ⁻¹ . 102 = Híbrido <i>bmr</i> ; 106 = Híbrido convencional.	78

Figura 22 - Espectros de FTIR do sorgo biomassa <i>in natura</i> e pré-tratados, na região do comprimento de onda de 1.900 a 1.300 cm^{-1} . 102 = Híbrido <i>bmr</i> ; 106 = Híbrido convencional.	78
Figura 23 - Espectros de FTIR do sorgo biomassa <i>in natura</i> e pré-tratados, na região do comprimento de onda de 1.300 a 800 cm^{-1} . 102 = Híbrido <i>bmr</i> ; 106 = Híbrido convencional.	79
Figura 24 -. Quantidade em gramas por litro de açúcar redutor liberado, após sacarificação e fermentação separado.	82
Figura 25 - Difratoograma da biomassa de sorgo <i>in natura</i>	85
Figura 26 - Difratoograma da biomassa de sorgo após pré-tratamento com ácido.....	86
Figura 27 - Difratoograma da biomassa de sorgo após pré-tratamento com ácido seguido de base.	87
Figura 28 - Curvas TG (a) e DTG (b) das biomassas <i>in natura</i> de sorgo.	88
Figura 29 - Curvas TG (a) e DTG (b) das biomassas de sorgo após tratamento ácido.....	88
Figura 30 - Curvas TG (a) e DTG (b) das biomassas de sorgo após tratamento ácido seguido de base.	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ranking de produção mundial de etanol e as principais fontes de biomassa utilizadas no ano de 2015.	30
Tabela 2 - Efeito de diferentes pré-tratamentos, suas vantagens e desvantagens, usados em materiais lignocelulósicos.	39
Tabela 3 - Valores médios de caracteres agronômicos e composição lignocelulósica do sorgo biomassa cultivado em Sete Lagoas e Couto de Magalhães de Minas, nas safras 2015/2016 e 2016/2017.	70
Tabela 4 - Teores médios de HMF g L ⁻¹ , Furfural g L ⁻¹ , ác. acético g L ⁻¹ e glicerol g L ⁻¹ do hidrolisado ácido do sorgo biomassa cultivado em Sete Lagoas e Couto de Magalhães de Minas na safra 2015/2016.	72
Tabela 5 - Valores médios de glicose, xilose e arabinose (g L ⁻¹) do hidrolisado ácido do sorgo biomassa cultivado em Sete Lagoas e Couto de Magalhães de Minas na safra 2015/2016.	72
Tabela 6 - Valores médios de celulose, hemicelulose, lignina (%) do sorgo biomassa in natura, após tratamento ácido, e após tratamento ácido seguido por alcalino, cultivado em Sete Lagoas e Couto de Magalhães de Minas nas safras 2015/2016 e 2016/2017. .	73
Tabela 7 - Atribuição das principais bandas observadas nos espectros de FTIR para sorgo biomassa.	80
Tabela 8 - Valores médios de rendimento de produção (Yp/s), hidrólise e eficiência fermentativa (Ef).	83
Tabela 9 - Valores médios etanol L ha ⁻¹ da biomassa de sorgo após tratamento ácido e ácido seguido por alcalino.	84
Tabela 10 - Índice de cristalinidade das biomassas do sorgo após diferentes tratamentos.	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – graus Celsius

AR – Açúcares redutores

AST – Açúcares solúveis totais

bep – barris equivalentes de petróleo

bmr – Brown midrib

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento

DNS – Ácido Dinitro Salicílico

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EPE – Empresa de Pesquisa Energética

FDA – Fibra em detergente ácido

FDN – Fibra em detergente neutro

FTIR – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

g – grama

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

ha – hectares

HMF – 5-Hidroximetilfurfural

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

l – Litro

m/v – relação massa /volume

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

NaOH – Hidróxido de sódio

PMS – Produção de matéria seca

PMV – Produção de matéria verde

rpm – rotação por minuto

S:L – Sólido:Líquido

SFS – Sacarification and Separate Fermentation

SSF – Simultaneous Sacarification and Fermentation

ton – toneladas

USDA – United States Department of Agriculture

YP/S – Rendimento em etanol

YT – Fator de rendimento teórico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral.....	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
3 REFERENCIAL TEÓRICO	27
3.1 Biocombustíveis	27
3.1.1 Biocombustível de primeira geração	29
3.1.2 Biocombustível de segunda geração	31
3.2 Parede celular vegetal	32
3.2.1 Componentes da parede celular vegetal.....	34
3.2.1.1 Celulose	34
3.2.1.2 Hemiceluloses	35
3.2.1.3 Lignina	36
3.3 Pré-tratamento.....	37
3.3.1 Hidrólise ácida	40
3.3.2 Hidrólise básica	41
3.3.3 Formação de inibidores	42
3.4 Sacarificação (hidrólise enzimática)	43
3.5 Fermentação.....	44
3.6 Sorgo (<i>Sorghum bicolor</i> L. Moench)	46
3.6.1 Origem e classificação botânica.....	47
3.6.2 Ecofisiologia e descrição morfológica	47
3.6.3 Tipos de sorgo	49
4 MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1 Aquisição da matéria prima	53
4.2 Instalação e condução do experimento	53
4.3 Caracteres avaliados na colheita	55
4.4 Caracterização físico-química da biomassa do sorgo – análise centesimal.....	56

4.4.1 Umidade	56
4.4.2 Cinzas	57
4.4.3 Fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA).....	57
4.4.4 Celulose, hemicelulose e lignina	58
4.5 Pré-tratamentos e Sacarificação	59
4.6 Fermentação	60
4.7 Variáveis de resposta do processo fermentativo	61
4.7.1 Quantificação de açúcares redutores (AR)	61
4.7.2 Quantificação de glicose	61
4.7.3 Quantificação do etanol	61
4.7.4 Fator de rendimento de produção (Yp/s).....	62
4.7.5 Eficiência fermentativa (Ef)	62
4.7.6 Rendimento de hidrólise	62
4.8 Análise estrutural da biomassa	63
4.8.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de FOURIER– FTIR	63
4.8.2 Microscopia eletrônica de varredura - MEV (SEM - scanning electron microscopy) 63	
4.8.3 Difração de Raios-X e cristalinidade - DRX	64
4.8.4 Análises Térmicas: Termogravimetria / Termogravimetria Derivada - (TG / DTG) ..	64
4.9 Análises estatísticas	64
 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	 66
5.1 Produtividade	67
5.2 Composição química das biomassas <i>in natura</i>	68
5.3 Concentração de açúcares e inibidores no hidrolisado ácido	71
5.4 Composição lignocelulósica das biomassas após pré-tratamentos	73
5.5 Análise MEV	75
5.6 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .	77
5.7 Rendimentos de etanol por genótipo (Sacarificação e Fermentação)	81
5.8 Difração de Raios X	84
5.9 Análises Térmicas: Termogravimetria / Termogravimetria Derivada - (TG / DTG)	87
 6 CONCLUSÃO	 91

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS93

ANEXO A - ANÁLISE DE VARIÂNCIA CONJUNTA DE CINCO HÍBRIDOS DE SORGO BIOMASSA NOS DOIS ANOS DE CULTIVO. SETE LAGOAS E COUTO DE MAGALHÃES DE MINAS, MG, SAFRAS 2015/2016 E 2016/2017.....111

ANEXO B - ANÁLISE DE VARIÂNCIA CONJUNTA DA COMPOSIÇÃO LIGNOCELULÓSICA DOS CINCO HÍBRIDOS DE SORGO BIOMASSA APÓS O PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO.112

ANEXO C - ANÁLISE DE VARIÂNCIA CONJUNTA DA COMPOSIÇÃO LIGNOCELULÓSICA DOS CINCO HÍBRIDOS DE SORGO BIOMASSA APÓS O TRATAMENTO ÁCIDO SEGUIDO POR BÁSICO.....113

ANEXO D - ANÁLISE DE VARIÂNCIA CONJUNTA DO RENDIMENTO DE HIDRÓLISE E ETANOL ($L\ HA^{-1}$) DA BIOMASSA DE SORGO APÓS TRATAMENTO ÁCIDO E ÁCIDO SEGUIDO POR BASE, DOS CINCO HÍBRIDOS DE SORGO BIOMASSA..... 114

ANEXO E - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DE GLICEROL, ÁCIDO ACÉTICO, HIDROXIMETILFURFURAL E FURFURAL ($G\ L^{-1}$) NO HIDROLISADO ÁCIDO OBTIDO DA BIOMASSA CULTIVADA NA SAFRA 2015/2016..... 115

1 INTRODUÇÃO

Conforme a perspectiva histórica, o paradigma da dependência dos recursos não renováveis é evidente, principalmente pelo fato de a sociedade atual ter evoluído sob um consumo ilimitado do petróleo e seus derivados. A partir da revolução industrial, observa-se que o crescimento populacional ocasionou o aumento do consumo dos combustíveis fósseis. No entanto, a expectativa de produção desse recurso torna-se cada vez menor, originando crises econômicas e geopolíticas.

Diante deste contexto, faz-se necessário a busca por alternativas e soluções com base em fontes de energias renováveis. Embora 80% da energia consumida mundialmente seja representativa dos combustíveis fósseis, e apenas 13,7% sob a perspectiva das energias renováveis (EPE, 2018), no setor de transporte essa realidade começa a sofrer significativa mudança. Atualmente, os biocombustíveis assumem um importante papel como alternativa dos combustíveis fósseis líquidos, sendo o biodiesel e o bioetanol os principais produtos (REN21, 2017). De acordo com a ANP (2018), em 2018 o Brasil produziu 122.709.819 barris equivalentes de petróleo (bep) de etanol, enquanto o biodiesel alcançou uma produção de 33.940.631 bep.

Observa-se que, nos últimos dez anos, houve grande crescimento da produção global dos biocombustíveis, tendo hoje os EUA como o maior produtor, e o Brasil o maior produtor de etanol na América do Sul (CONAB, 2015; BP, 2015; REN21, 2017). Até 2006 o Brasil era o maior produtor mundial de etanol, perdendo a partir de então a posição para os EUA, que chegou a produzir duas vezes mais que o Brasil, embora o etanol produzido por eles seja de milho, que apresenta um balanço energético menos eficiente e com maior custo. Considera-se, também, que a partir de 2013 a produção global de biodiesel tornou-se significativa, pois somente era relatada na Europa (BP, 2015).

De modo geral, o mercado de biocombustíveis apresenta-se com uma expectativa de incremento para os próximos anos (OECD-FAO, 2015), estimulado principalmente por políticas de estado, que atuam com regras mandatórias (REN21, 2017) e determinam a mistura de biocombustíveis aos combustíveis fósseis ou até mesmo o uso de biocombustíveis puros em motores de ciclo otto (IEA, 2011). O Brasil, referência na utilização de recursos renováveis em sua matriz energética, embora tenha uma expressiva capacidade de produção de etanol, apresenta-se com o desafio de diversificar as matérias-primas para a produção de biocombustíveis, que ainda dependente da soja e da cana-de-açúcar. Além disso, a diversificação poderá promover a descentralização da produção, que também é um grave

problema, pois as regiões produtoras do país encontram-se distantes das regiões consumidoras, o que afeta a logística e consequentemente o preço.

Além do cenário exposto, referente à limitação de oferta e às altas de preços dos recursos não renováveis, existem fortes debates sobre possíveis e necessárias alternativas que minimizem impactos ambientais de emissão de gases de efeito estufa e que em consequência, não prejudiquem a produção e oferta de alimentos. Com isso, a busca do etanol extraído de celulose está mobilizando um número crescente de pesquisadores voltados para ampliação da produtividade do etanol brasileiro.

O Brasil, considerado o maior produtor agrícola de cana-de-açúcar e também maior produtor de etanol originado dessa cultura (CONAB, 2017), destaca-se com o desafio de aproveitar o bagaço e a palha, fontes de celulose que respondem por dois terços da energia da planta, na conversão de biocombustível (MARQUES, 2009). Entretanto, percebe-se que existem outras biomassas que poderiam ser exploradas para a produção de etanol de segunda geração, devido às suas características de grandes quantidades de celulose.

O sorgo biomassa (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), portanto, é uma planta promissora para a produção de etanol celulósico. Além de proporcionar uma maior oferta de etanol, existe a vantagem de ser uma cultura menos exigente em água e nutrientes comparada à cana-de-açúcar, tolerante ao estresse hídrico, além de não atuar na competição de produtos para a alimentação humana.

A relevância deste projeto baseou-se na possibilidade de aproveitamento de uma cultura energética para a produção de etanol celulósico, podendo ser cultivada na entressafra da cana-de-açúcar, otimizando assim a infraestrutura já existente para a obtenção do etanol de primeira geração.

Sendo assim, pretendeu-se com este estudo avaliar a potencialidade comparativa de diferentes genótipos de sorgo biomassa para a produção de etanol de segunda geração.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Seleção de genótipos e produção de sorgo biomassa com alta produtividade, cultivados nas regiões de Sete Lagoas e do Alto Vale do Jequitinhonha, no Estado de Minas Gerais, como potenciais matérias primas para a indústria de etanol de segunda geração.

2.2 Objetivos específicos

- i) Cultivar diferentes genótipos de sorgo biomassa nas cidades de Sete Lagoas e Couto de Magalhães de Minas;
- ii) Avaliar a produtividade em massa seca de cada genótipo em relação às diferentes condições edafoclimáticas;
- iii) Comparar a produtividade e qualidade da matéria prima dos híbridos de sorgo biomassa de nervura marrom *bmr*, em relação aos híbridos de sorgo biomassa convencionais;
- iv) Analisar a composição lignocelulósica da matéria prima bruta e após os tratamentos;
- v) Obter análises físico-químicas das biomassas *in natura* e após os tratamentos;
- vi) Analisar o rendimento de sacarificação e do etanol produzido comparativamente aos genótipos testados.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

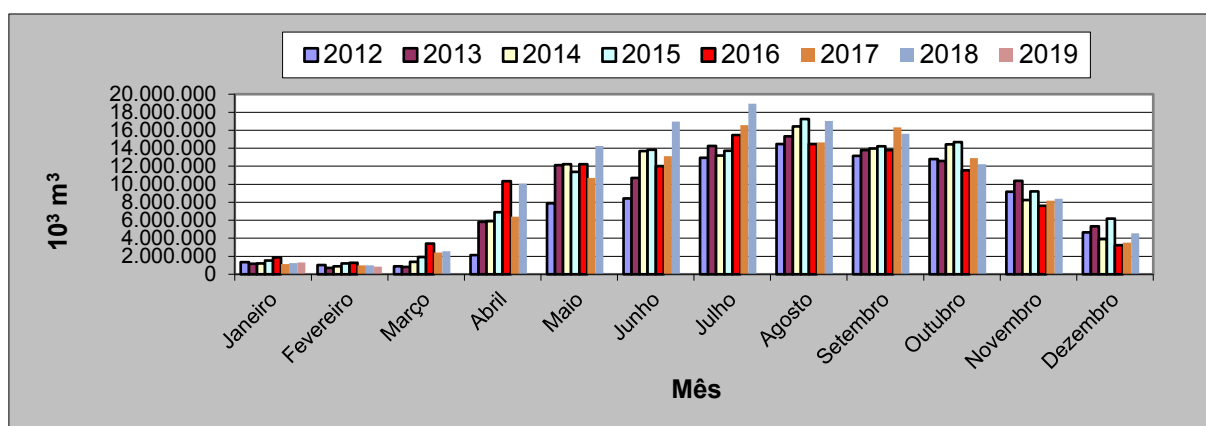
3.1 Biocombustíveis

A necessidade de diversificar a matriz energética mundial, predominante dos combustíveis fósseis, ocasionou a busca por tecnologias ambientalmente e economicamente sustentáveis. Desde a década de 70, com a crise do petróleo, os biocombustíveis ganharam destaque como fontes alternativas de energia. A partir de então, o bioetanol e o biodiesel mostraram-se potenciais substitutos dos combustíveis líquidos não renováveis, ajudando a mitigar os impactos ambientais associados às mudanças climáticas (JAISWAL *et al.*, 2017).

O Brasil, apesar de ser referência na produção do etanol a partir da cana-de-açúcar (DE SOUZA *et al.*, 2014) e do biodiesel a partir da soja, tem grande potencialidade de ampliar a oferta de energia a partir da diversificação do material vegetal utilizado, fato que é fomentado pela rica biodiversidade intrínseca do país.

Ressalta-se que além dos dois principais biocombustíveis líquidos comerciais, o etanol e o biodiesel, as pesquisas avançaram muito em relação a fontes energéticas, podendo ser tomado como exemplo o biocombustível de aviação, o chamado QAV, e o biometano que é um biocombustível gasoso (ANP, 2017a). Como o bioetanol é alvo deste estudo, na Figura 1 pode-se observar a produção desse biocombustível em barris equivalentes de petróleo no Brasil, no período de 2012 a março de 2019.

Figura 1 – Produção de etanol no Brasil em barris equivalentes de petróleo, no período de 2012 a 2019.



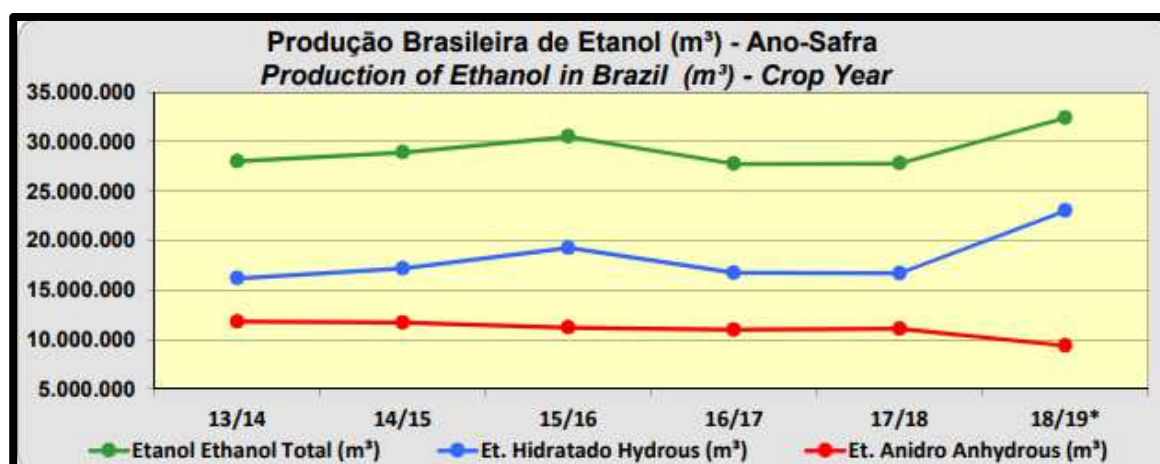
Fonte: ANP (2018).

Os veículos leves de ciclo otto utilizam duas categorias de etanol: (i) o etanol hidratado, composto por 95% a 96% de etanol e o restante de água, usado diretamente nos modelos *flex full*, e (ii) o etanol anidro, composto por 99,6% de etanol absoluto, usado na composição da gasolina na proporção de 27%, como mistura obrigatória. De acordo com o Boletim do Etanol nº 09, publicado em fevereiro de 2017 (ANP, 2017b), existem 384 plantas de etanol autorizadas no Brasil, tendo como capacidade o total de 333.919 m³/dia de produção; desse total, 216.883 m³ são de etanol hidratado e 117.036 m³ de etanol anidro.

Apesar dos números positivos, e de a safra 2017/2018 alcançar um acumulado total de 27,78 bilhões de litros de etanol (Figura 2) (MAPA, 2018), o país tem que conviver com importações do biocombustível para atender o mercado interno, e nos primeiros seis meses do ano de 2017 o país importou quase o dobro de 2016 (UNICA, 2017).

Figura 2 - Produção brasileira de etanol (m³) entre as safras 2013/2014 e 2018/2019.

Valores atualizados em 23/04/2019.



Fonte: MAPA (2019).

Apesar do cenário em que se encontra o sistema produtivo do etanol nacional, o governo brasileiro vem trabalhando para tentar recuperar a competitividade da produção, por meio de programas como o RenovaBio lançado pelo Ministério de Minas e Energia, que visa contribuir para minimizar os desafios enfrentados pelo setor de bioenergia (EPE, 2017), como também por meio de políticas de atualização tarifárias (OECD/FAO, 2016), para a importação de biocombustíveis concorrentes aos nacionais. Portanto, além do desafio de matérias primas que atendam o requisito energético, de melhores políticas públicas que visem fomentar e estimular a produção nacional, há também a necessidade de correlacionar uma eficiente tecnologia no processamento dessa nova biomassa, o que se pode utilizar para diferenciar as possíveis gerações de biocombustíveis.

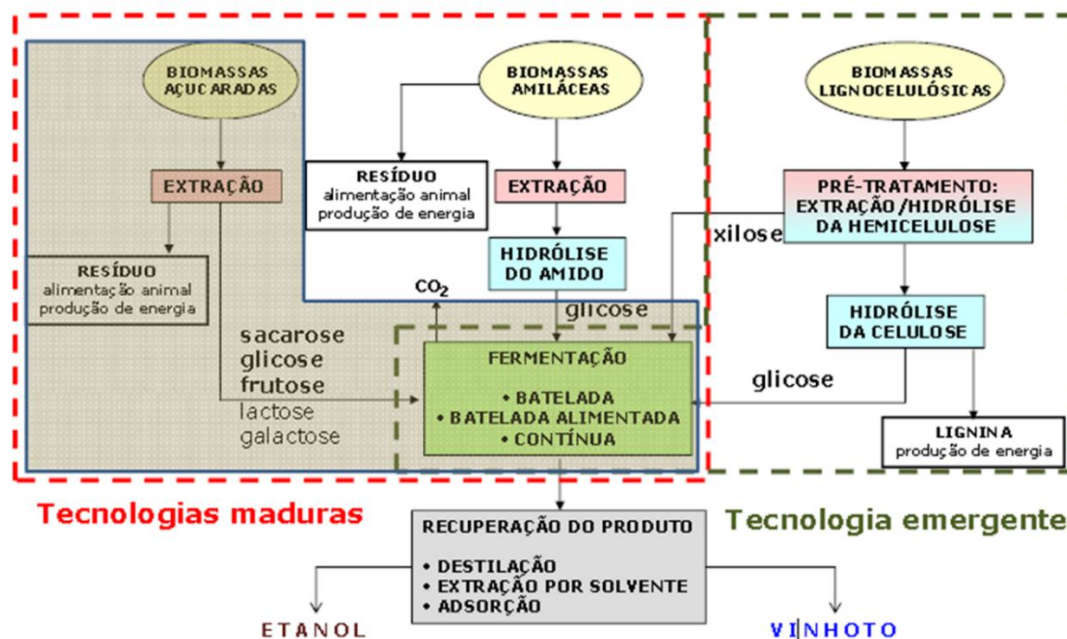
3.1.1 Biocombustível de primeira geração

As gerações de biocombustíveis podem assim serem classificadas de acordo com a tecnologia empregada para a sua obtenção. Pode-se considerar que toda a produção de biocombustíveis comercialmente explorada no mundo advém das tecnologias denominadas de primeira geração (BHATIA *et al.*, 2017). Dessa maneira, de acordo com a Comissão Europeia (2015), o Parlamento Europeu classificou os biocombustíveis de primeira geração basicamente pelo fato de serem produzidos por matérias primas cultivadas, além de já possuírem uma tecnologia de processamento bem definida, e, contudo, denominou os biocombustíveis de segunda geração, como os obtidos principalmente a partir de biomassa lignocelulósica e os de terceira geração sendo os derivados de algas.

Destaca-se também a possibilidade dos biocombustíveis de quarta geração, que se referem a organismos de engenharia genética, otimizados para melhorar o desempenho de armazenamento de carbono (GAMBELLI *et al.*, 2017). Assim como afirma Aro (2016), a quarta geração de biocombustíveis ainda pode ser considerada prematura, mas esse combustível microbiano metabolicamente modificado poderá ser uma poderosa tecnologia para produção eficiente de combustíveis líquidos.

Os biocombustíveis de primeira geração ainda são os protagonistas, e o bioetanol sendo o combustível renovável mais utilizado mundialmente (GHOSH, 2016), tem-se como exemplo dessa tecnologia o bioetanol de fontes sacaríneas, como a cana-de-açúcar, a beterraba açucareira e o sorgo sacarino (CASTAÑEDA-AYARZA e CORTEZ, 2017), as quais fornecem a sacarose prontamente disponível na planta para posterior fermentação e obtenção do etanol (KAZAMIA E SMITH, 2014). Nessas culturas o carboidrato está presente na forma simples, monômeros de glicose (REIS *et al.*, 2016)

A cultura do milho também é fortemente utilizada para a produção de etanol de primeira geração, principalmente explorado nos Estados Unidos, onde foi responsável por 98% do etanol produzido no país em 2015 (RFA, 2016). Por ser uma fonte amilácea, assim como a batata, a mandioca e os grãos de sorgo, fornece o amido que é fonte de glicose para a fermentação. No entanto, quando comparado ao etanol de cana-de-açúcar, o etanol produzido a partir de milho apresenta um custo final mais elevado, devido ao fato de exigir uma etapa adicional, o qual o amido que é um polissacarídeo, é hidrolisado por meio de enzimas amilases em monômeros de glicose (CHEROENNET e SUWANMANEE, 2017; MONOCHIO *et al.*, 2017). Na Figura 3 pode-se observar um fluxograma da produção de etanol, no qual diferentes rotas são empregadas.

Figura 3 - Fluxograma da produção de etanol a partir de diferentes rotas.

Fonte: PEREIRA Jr., (1991).

Há uma forte pressão da comunidade internacional em relação a produção de biocombustíveis, pois alega-se que os cultivos comerciais visando a produção de energia exigem grandes áreas agrícolas, o que poderia resultar em uma concorrência com a produção de alimentos, aumento do desmatamento e poluição associada à produção agrícola (CORREA *et al.*, 2017). Na Tabela 1, observa-se o ranking da produção mundial de etanol e as principais fontes de biomassa utilizadas por cada país no ano de 2015.

Tabela 1 - Ranking de produção mundial de etanol e as principais fontes de biomassa utilizadas no ano de 2015.

País	Produção de etanol em 2015 (milhões de m³)	% de aumento (2009-2015)	Principais matérias primas
EUA	56.05	35%	Milho
Brasil	26,85	8%	Cana-de-açúcar
União Europeia	5.25	33%	Beterraba açucareira
China	3.08	50%	Milho / trigo
Canadá	1,65	50%	Milho / trigo
Tailândia	1.26	25%	Cana-de-cana / mandioca
Argentina	0,80	35%	Cana-de-açúcar
Índia	0,80	8%	Cana-de-açúcar

Fonte: MONOCHIO *et al.*, (2017), adaptado RFA (2015).

3.1.2 Biocombustível de segunda geração

Atender as demandas futuras de energia e combustíveis, aliado a tentativa de minimizar o aumento da temperatura global ocasionado pela elevada emissão de CO₂, requer ações conjuntas da população em geral e principalmente da comunidade acadêmica, a qual tem se esforçado para otimizar produtos e processos para conversão energética. Por isso, as tecnologias de produção de biocombustíveis de segunda geração são consideradas aliadas no processo de garantir a segurança energética, mitigar impactos ambientais e promover a segurança alimentar (CANABARRO *et al.*, 2017; CVALETT *et al.*, 2017), pois essas tecnologias baseiam-se na utilização de culturas não alimentares que podem ser cultivadas em áreas marginais, além de exigirem menores concentrações de insumos.

O etanol de segunda geração, ou etanol 2G como está sendo denominado segundo Sil e Neto (2013), tem sido amplamente estudado em vários países, principalmente utilizando o bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima lignocelulósica (ALBARELLI *et al.*, 2014; BAZOTI *et al.*, 2017; CARPIO e SOUZA, 2017). Até o momento há mais de trinta projetos de produção de etanol celulósico em escala comercial, dos quais doze estão nos Estados Unidos e apenas dois no Brasil (SALLES-FILHO *et al.*, 2017).

Contrariamente às tecnologias de primeira geração, as matérias primas utilizadas na produção do etanol 2G são complexas, constituindo-se de um material fibroso, as quais não podem ser digeridas diretamente pelas leveduras tradicionais (MONOCHIO *et al.*, 2017). Entretanto, a tecnologia promissora de segunda geração torna-se possível por meio de processos de hidrólise enzimática da biomassa (RAELE *et al.*, 2014; REIS *et al.*, 2016), para produzir monômeros de açúcares fermentescíveis.

A biomassa lignocelulósica permitirá a ampliação da produção de etanol, sem aumento da área cultivada, que, ademais, poderá tornar o etanol competitivo em custos (SILVA *et al.*, 2013). Biomassa pode ser considerada qualquer matéria orgânica passível de ser transformada em energia (ANEEL, 2008), incluindo culturas energéticas, gramíneas, resíduos de madeira e resíduos florestais (SINGH; MAHANTA; BORA, 2017), mas os rejeitos e resíduos agrícolas em sua maioria contendo materiais lignocelulósicos ocupam lugar de destaque (SOUZA *et al.*, 2012).

A composição lignocelulósica pode variar de acordo com a espécie vegetal e condições edafoclimáticas (KANG e TAN, 2016), sendo composta basicamente por 40 a 60% de celulose, 20 a 40% de hemicelulose e 15 a 25% de lignina (MOREIRA, 2005; SINGH; MAHANTA; BORA, 2017). A caracterização da biomassa utilizada, portanto, determinará as

etapas futuras de pré-tratamento, os quais promoverão a desconstrução dessa matéria-prima (REIS *et al.*, 2016).

A partir do referenciado torna-se perceptível que o desenvolvimento de processos para a produção de etanol a partir das biomassas disponíveis depende de otimizações, de forma integrada, de diversas etapas: pré-tratamento, hidrólise e fermentação dos hidrolisados (GOUVEIA *et al.*, 2009). A valorização dos materiais lignocelulósicos na cadeia de bicompostíveis impulsionará cada vez mais o país ao lugar de destaque em energias limpas, além de promover um desenvolvimento paralelo de coprodutos e processos (FAVARO e MIRANDA, 2013).

Nessa mesma direção, segundo Chaves e Gomes (2014), os biocombustíveis podem desempenhar um importante papel no fomento da economia verde. Por questões de segurança, diversidade e sustentabilidade, como também para mitigação do efeito estufa, todos os países devem investir em pesquisas, tecnologias e inovação na busca de combustíveis a partir de fontes renováveis (GUEDES *et al.*, 2010).

3.2 Parede celular vegetal

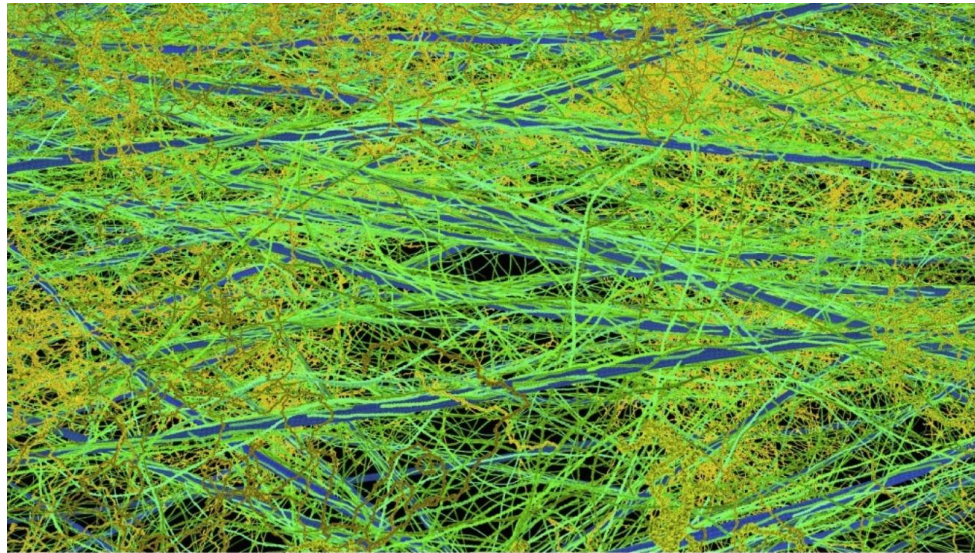
A biomassa vegetal, fonte de carbono orgânico, compreende uma complexa estrutura formada por diversas macromoléculas, tendo a parede celular como maior percentual dessa biomassa, a qual é constituída principalmente por microfibrilas de celulose embutidas em uma matriz de polissacarídeos (Figura 4), além de proteínas e substâncias fenólicas (SANDHU; RANDHAWA; DHUGGA, 2009; DOMÍNGUEZ *et al.*, 2017).

Devido à sua especificidade e à alta recalcitrância é que permitiu o sucesso e o estabelecimento das plantas no sistema terrestre (JOHNSON, 2018), proporcionando proteção contra estresses, suporte físico, e resistência das células vegetais contra a expansão pela absorção de água (MARTÍNEZ-SANZ *et al.*, 2017). No entanto, essa complexidade também se apresenta como um aspecto desafiador da ciência, pois recai na busca de inúmeros processos para a desagregação desses polímeros de forma eficiente e econômica.

Há também que se considerar que a parede celular vegetal é um recurso significativo para a nutrição humana e animal, além de ser fonte primordial de fibras para as indústrias têxteis e de celulose (FARINAS, 2011). Contudo, também denominada de biomassa lignocelulósica, a parede vegetal caracteriza-se por sua eficiente participação nas fontes de energia renováveis sob o aspecto de matéria prima para a combustão, assimilação de carbono

e, portanto, minimização do efeito estufa, quanto na produção dos chamados biocombustíveis de segunda geração (JOHNSON *et al.*, 2018).

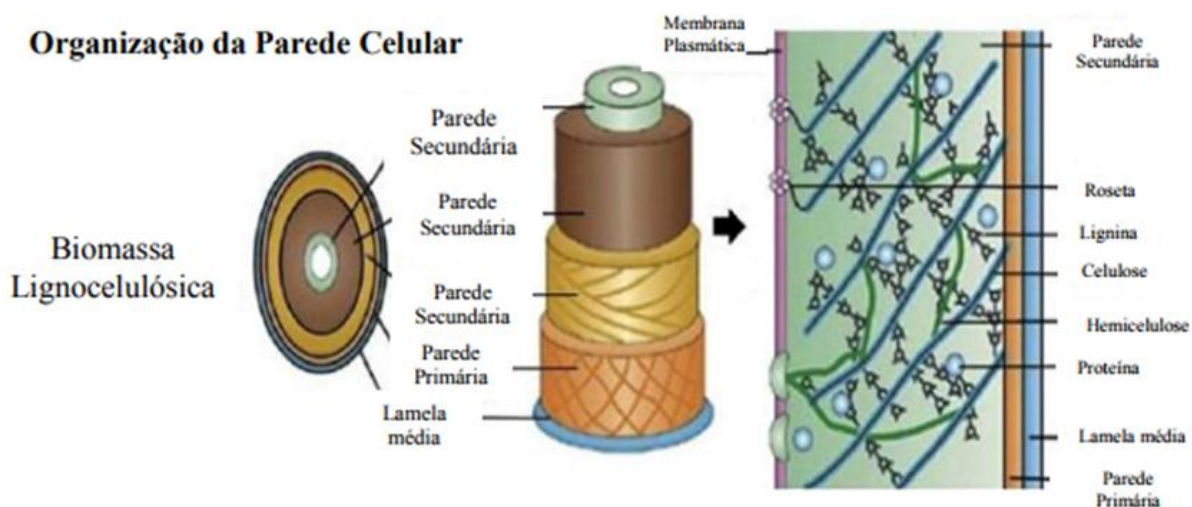
Figura 4 - Em azul está representado a celulose, em verde as hemiceluloses e em amarelo a pectina.



Fonte: JOHNSON *et al.*, (2018).

A morfologia da parede celular pode ser dividida em três regiões (Figura 5): lamela média, parede primária e parede secundária (RAVEN, EVERT, EICHHORN, 2007). Quimicamente e estruturalmente, a proporção dos componentes da parede celular vegetal pode variar de acordo com diversos fatores (PATTATHIL *et al.*, 2015): a espécie, idade e nutrição da planta, como também manejos culturais. Além disso, na família Poaceae, na qual pertence as gramíneas, a parede celular se caracteriza por possuir arabinoxilanos como principal hemicelulose, expressiva quantidade de celulose e reduzido conteúdo de pectinas e proteínas (GRANDIS *et al.*, 2014).

Figura 5 - Esquema ilustrativo da estrutura da parede celular vegetal.



Fonte: MENON e RAO (2012).

As paredes primárias em gramíneas são caracterizadas pela abundância significativa de polissacarídeos hemicelulósicos, glucuronoarabinoxilanos e glucanos de ligação mista, com proporções relativamente pequenas de xiloglucanos e proteínas estruturais, como proteínas de arabinogalactano (PATTATHIL *et al.*, 2015). No entanto, as paredes secundárias caracterizam-se por possuir expressiva quantidade de celulose. Nas gramíneas tropicais, o elevado conteúdo de parede celular está associado a aspectos de natureza anatômica das espécies, em razão da alta proporção de tecido vascular característico das plantas C4 (VAN SOEST, 1994).

3.2.1 Componentes da parede celular vegetal

3.2.1.1 Celulose

Estruturalmente, a celulose é um homopolissacarídeo de glicose, onde as unidades monossacarídeas são unidas por ligações de hidrogênio em ligações β -1,4 (NAGARAJAN *et al.*, 2017). Sendo um polímero linear, é considerado o polímero mais abundante na Terra e principal componente da parede célula vegetal, e estruturalmente as microfibrilas são revestidas por hemiceluloses e lignina (KANNAM *et al.*, 2017).

Por apresentar ligações de hidrogênio intermoleculares, e uma forte tendência em formar ligações de hidrogênio intramoleculares, a celulose caracteriza-se por possuir alta rigidez, ser altamente insolúvel e resistente à maior parte dos solventes orgânicos (TEIXEIRA;

SIQUEIRA; RYHÁRA, 2016). Além disso, as microfibrilas de celulose podem apresentar diferentes graus de cristalinidade e polimerização, o que pode ser determinante para muitas aplicações futuras, como a redução da recalcitrância da biomassa para hidrólise na produção de biocombustíveis celulósicos (CARROLL e SOMERVILLE, 2009).

A disposição estrutural da celulose (Figura 6), com a presença de grupos hidroxila na superfície das microfibrilas (MARTÍNEZ-SANZ *et al.*, 2017), garante a estabilidade da molécula (SUN *et al.*, 2011).

Figura 6 - Moléculas de glicose unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo β -1,4.



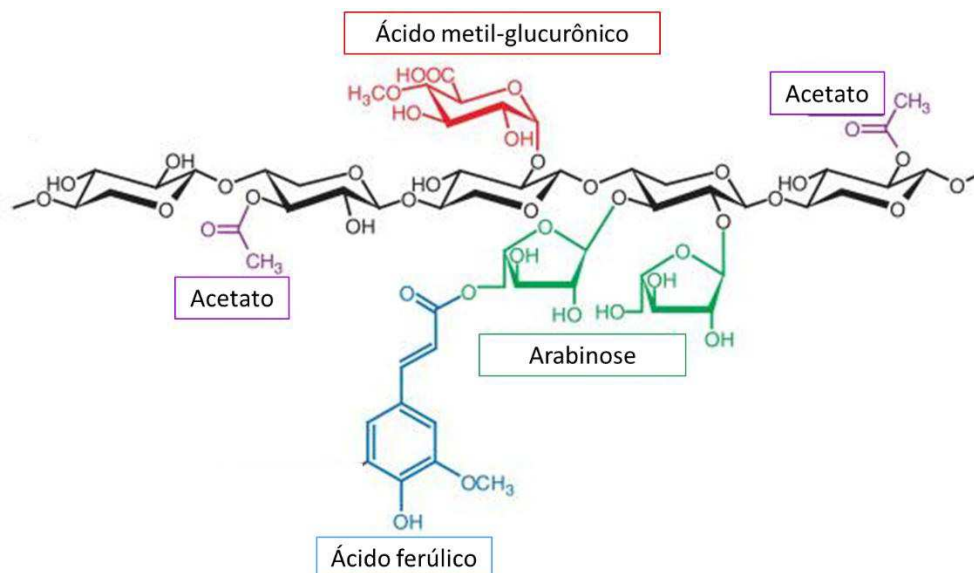
Fonte: TAIZ e ZEIGER (2002).

3.2.1.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses caracterizam-se por serem um heteropolissacarídeo (Figura 7), constituído de polímeros de pentoses e hexoses (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014), os quais podem conter D-glicose, D-galactose, D-manose, D-xilose, L-arabinose, ácido D-glucurônico e ácido 4-O-metil-glucurônico, que se ligam à superfície das microfibrilas de celulose através das ligações de hidrogênio, e à lignina através de ligações covalentes (RAVINDRAN e JAISWAL, 2016).

Sendo um polímero heterogêneo e ramificado (FARHAT *et al.*, 2017a), a hemicelulose pode apresentar-se com diferentes estruturas e composição entre diferentes biomassas, e é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza (PENG e WU, 2010). Dessa forma, a hemicelulose tem sido considerada um substituto verde para os polióis derivados de petróleo (FARHAT *et al.*, 2017b), principalmente por suas características como a bioatividade, a biocompatibilidade e a biodegradabilidade (LI *et al.*, 2018).

Figura 7 - Estrutura típica da hemicelulose mostrando as diferentes ligações e compostos encontrados nas ramificações



Fonte: Adaptado de DODD e CANN (2009).

Devido às interações com outros componentes da parede celular, é necessário processos de pré-tratamento para a remoção da hemicelulose (FARHAT *et al.*, 2017a; LI *et al.*, 2018). A configuração ramificada torna a estrutura das hemiceluloses irregular, conferindo ausência de cristalinidade e sua natureza hidrofílica, aumentando a flexibilidade do agregado e podendo diminuir a recalcitrância do polímero (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014; (FARHAT *et al.*, 2017b).

Considerando as diferentes unidades monoméricas que compõem as hemiceluloses, a xilose é a que se destaca, classificando, dessa forma, a hemicelulose como xilana, assim como as galactanas e arabinanas com predomínio de galactose e arabinose, respectivamente (GANDINI e BELGACEM, 2008).

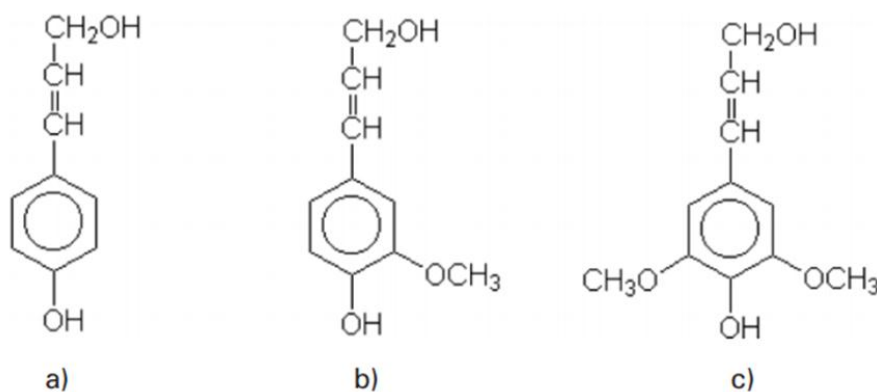
3.2.1.3 Lignina

A lignina é o terceiro polímero mais importante na composição da parede celular vegetal, e, depois da celulose, é a substância orgânica mais abundante nas plantas (TAIZ e ZEIGER, 2004). Concentra-se em tecidos relacionados com condução de solutos e suporte mecânico (FARINAS, 2011), e seu arranjo estrutural e sua hidrofobicidade protege os carboidratos da degradação por microorganismos ou enzimas (GORDOBIL *et al.*, 2016). Sua

resistência estrutural inibe seu consumo pelos herbívoros e sua estabilidade química torna-a indigerível por esses animais (TAIZ E ZEIGER, 2004).

Diferentemente dos polissacarídeos, a lignina representa um conjunto de polímeros amorfos, de alto peso molecular, com natureza fenólica e altamente recalcitrante (SHAHZADI *et al.*, 2014). Constituída por grupos aromáticos e alifáticos, possui em suas unidades monoméricas três precursores primários, sendo o álcool *p*-cumarílico; o álcool coniferílico e o álcool sinapílico, cuja a representação química é a da Figura 8 (ANWARA; GULFRAZ; IRSHAD, 2014; CHEN e WAN, 2017).

Figura 8 - Monômeros precursores da lignina (a) álcool *trans*-para-cumárico, (b) álcool *trans*-coniferílico e (c) álcool *trans*-sinapílico.



Fonte: FARINAS (2011).

3.3 Pré-tratamento

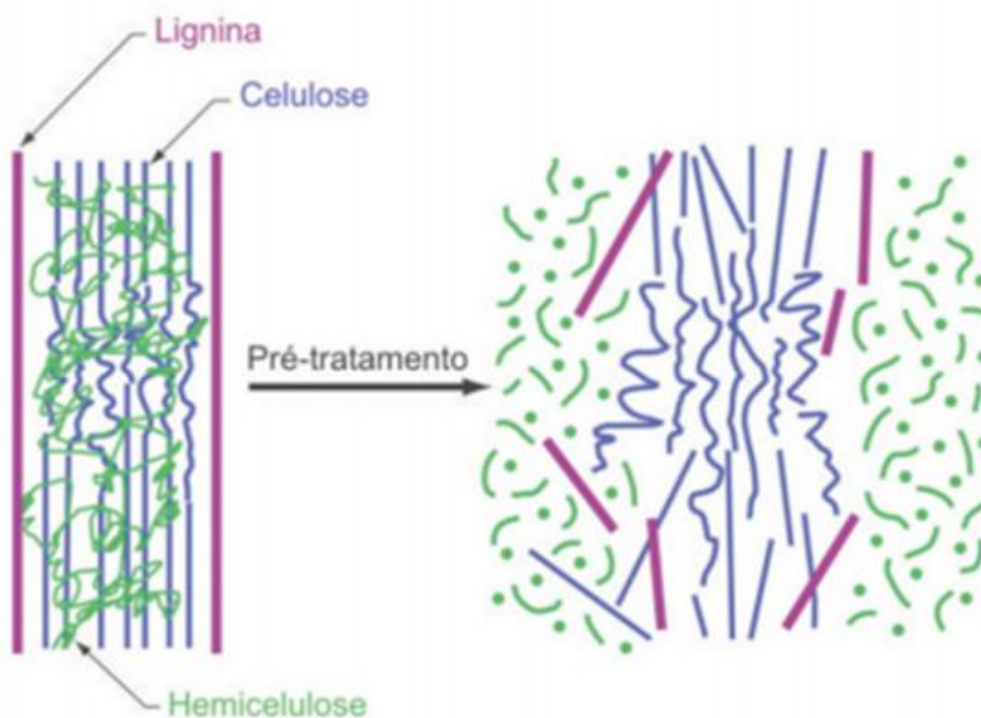
A produção de etanol de segunda geração caracteriza-se por multiprocessos que são fundamentais para disponibilizar os açúcares presentes na celulose e hemicelulose, os quais são hexoses e pentoses, respectivamente. A recalcitrância lignocelulósica ainda representa um gargalo na bioconversão enzimática, sendo necessário, portanto, etapas para remover as barreiras físicas e químicas e, conseqüentemente, aumentar a digestibilidade enzimática da celulose (YAN *et al.*, 2015).

Assim sendo, o pré-tratamento é o primeiro passo para a produção do biocombustível de segunda geração. Além disso, essa etapa eleva a área superficial da biomassa, a porosidade do material e promove a hidrólise da hemicelulose (ROSSI *et al.*, 2014). Entretanto, existem diversos pré-tratamentos físicos, químicos e ou enzimáticos que podem ser empregados, a fim de aumentar a conversão enzimática, a eficiência de fermentação e, contudo,

até mesmo a produção de coprodutos indesejáveis (MUPONDWA *et al.*, 2017a). Na Tabela 2 observa-se alguns pré-tratamentos usados em materiais lignocelulósicos, bem como suas vantagens e desvantagens de aplicação.

No processamento da biomassa, portanto, os pré-tratamentos resumem-se em romper a estrutura lignocelulósica (Figura 9), aumentando o acesso das enzimas aos polissacarídeos que posteriormente serão fragmentados em monômeros fermentescíveis (LIU *et al.*, 2017). A quantificação desses açúcares na biomassa é extremamente importante, pois determina o rendimento teórico de etanol (SINGH; MAHANTA; BORA, 2017).

Figura 9 - Alterações do complexo lignocelulósico após pré-tratamento.



Fonte: SANTOS *et al.*, (2012).

Tabela 2 - Efeito de diferentes pré-tratamentos, suas vantagens e desvantagens, usados em materiais lignocelulósicos.

Pré-tratamento		Características composicionais			Vantagens	Desvantagens
		Celulose	Hemicelulose	Lignina		
Físico	Moinho	Intensiva redução do grau de cristalinidade	Não remove	Não remove	Aumento da área superficial específica	Não altera a polimerização
	Ácido diluído	Pouca despolimerização	80 – 100% de remoção	Pouca remoção, mas ocorre mudança na estrutura	Condições médias, e altas produções de xilose.	Difícil recuperação do ácido. Corrosivo e relativamente custoso.
Químico	Hidróxido de sódio	Inchação significativa	Considerável solubilidade	Remoção eficiente de toda a lignina.	Remoção efetiva de ésteres	Reagente caro; recuperação alcalina.
	Hidróxido de cálcio	Pouca despolimerização	Significativa solubilização	Solubilização parcial: ~40%	Efetiva remoção de lignina e acetil, baixo custo	Menor efetividade devido a pouca solubilidade da cal.
	Ozonólise	Não foi observada despolimerização	Pequena solubilização	Solubilização acima de 70%	Efetiva deslignificação em condições suaves	Altamente caro devido à exigência de grande quantidade de ozônio.
	Organosolv	Considerável inchação	Significativo, quase completa	Significativo, pode ser quase completa	Alta produção de xilose, efetiva deslignificação	O custo do solvente e os catalisadores são elevados.
Biológico	Biológico	20 – 30% de despolimerização	Acima de 80% de solubilização	~40% de deslignificação	Baixo requerimento de energia, efetiva deslignificação	Perda de celulose, baixa taxa de hidrólise
Combinado	Explosão a vapor	Pouca despolimerização	80 – 100% de remoção	Pouca remoção, mas ocorre mudança na estrutura.	Energia eficiente, nenhum custo de reciclagem	Degradação da xilana como produto inibitório

Fonte: SANTOS *et al.*, (2012).

Ao desestruturar a parede celular vegetal, o pré-tratamento também permite a extração da lignina, fato que é essencial para otimizar a obtenção do biocombustível líquido. Entre os componentes da biomassa, a lignina atua negativamente na hidrólise enzimática por três principais fatores: a adsorção competitiva, a inibição química e o impedimento estérico (KE e CHEN, 2013). Dessa forma, a deslignificação e exposição das fibras celulósicas dependerá da escolha adequada do pré-tratamento dependendo da biomassa utilizada (REIS *et al.*, 2016).

A sacarificação da biomassa lignocelulósica sem qualquer pré-tratamento, portanto, pode render menos de 20% dos açúcares totais, enquanto que após o pré-tratamento, chega a atingir até 90% (SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016). O desafio de manipular matérias primas heterogêneas a fim de convertê-las em componentes uniforme permanece na busca de condições ideais adaptadas a cada tipo de biomassa (MUPONDWA *et al.*, 2017a). O pré-tratamento, portanto, remove as estruturas ligadas a celulose e modifica a estrutura cristalina desse polissacarídeo, aumentando assim o acesso às enzimas celulolíticas (PHITSUWAN; SAKKA; RATANAKHANOKCHAI, 2016).

3.3.1 Hidrólise ácida

A hidrólise ácida proporcionada pelo pré-tratamento com ácidos, principalmente utilizando o ácido sulfúrico (H_2SO_4), ainda se destaca no uso para a despolimerização de polissacarídeos (NEGAHDAR; DELIDOVICH; PALKOVITS, 2016). Notadamente a utilização de ácido altamente diluído (pH 1,5-2,5), a altas temperaturas de operação (200-230 °C) é mais favorável e mais frequentemente aplicado (RASTOGI e SHRIVASTAVA, 2017).

A maioria dos estudos considera a hidrólise ácida, principalmente a partir de um ponto de vista prático, visando reduzir os custos do processo e obter altos rendimentos dos produtos (CHEN, YE e SHEEN, 2012). Portanto, é comprovado que a acessibilidade da celulose pode ser aumentada pelo tratamento com ácidos diluídos (SAHA *et al.*, 2005), pois a fibra vegetal diminui o grau de polimerização em um curto espaço de tempo (FUNAHASHI *et al.*, 2017).

A remoção eficiente da fração hemicelulósica, catalisada por ácidos (HOSSEINI *et al.*, 2010), antes da fermentação é crucial, porque a enzima celulase é significativamente inibida por xilose, e especialmente xiloligômero. O processo de hidrólise ácida resulta em um hidrolisado rico em açúcares de pentose, com xilose como o principal componente, mas também pode conter glicose e arabinose (TIZAZU e MOHOLKAR, 2017). Do ponto de vista da

biossíntese, a xilose é molécula seminal e pode ser convertida através da via fermentativa para inúmeros produtos de valor agregado, como o xilitol (TRAN *et al.*, 2004; ARRIZON *et al.*, 2012).

A hidrólise ácida da celulose e da hemicelulose além de obter xilose, gera também monômeros solúveis em água, como glicose, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural (HMF) (LAVARACK, GRIFFIN e RODMAN, 2002; TIZAZU e MOHOLKAR, 2017) que, por sua vez, pode ser convertido a ácido fórmico e são quantificados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência. O tratamento com ácido diluído, portanto, diminui quase 100% a fração de hemicelulose, permitindo o aumento na concentração de celulose na biomassa. No entanto, o pré-tratamento ácido não é eficaz para dissolver a lignina, mas pode desorganizar e aumentar a susceptibilidade da celulose à hidrólise enzimática.

3.3.2 Hidrólise básica

Nos processos de obtenção do etanol celulósico, um grande obstáculo é a remoção da lignina, por ser altamente resistente à solubilização e também um inibidor importante para hidrólise de celulose e hemicelulose (KUMAR e SHARMA, 2017). Portanto, o principal efeito do pré-tratamento alcalino constitui-se na dissolução da lignina e desconstrução parcial da hemicelulose, promovendo maior reatividade da fibra (NEGAHDAR; DELIDOVICH; PALKOVITS, 2016).

O pré-tratamento químico com hidróxido de sódio (NaOH) pode eliminar ou modificar a lignina através da quebra de ligações e afrouxamento de ligações cruzadas entre hemicelulose e lignina, resultando em maior porosidade (UMAGILIYAGE *et al.*, 2015). Além do hidróxido de sódio, também são usados como catalizadores alcalinos o hidróxido de potássio, o hidróxido de cálcio e o amoníaco, pois são operados a temperaturas mais baixas e não necessitam de reatores complexos, apesar de requerer um tempo longo de ação (de horas para dias) (WAN; ZHOU; LI, 2011).

O hidróxido de sódio é considerado um catalisador básico mais forte, e a eficiência no pré-tratamento é evidenciada por uma maior produção de açúcares fermentáveis através da hidrólise enzimática, ao compararmos a outros pré-tratamentos alcalinos (KIM; LEE; KIM, 2015). O hidróxido de sódio ataca as ligações entre a lignina e hemicelulose do complexo lignina-carboidrato (CLC), levando à ruptura das ligações éter e éster desta estrutura.

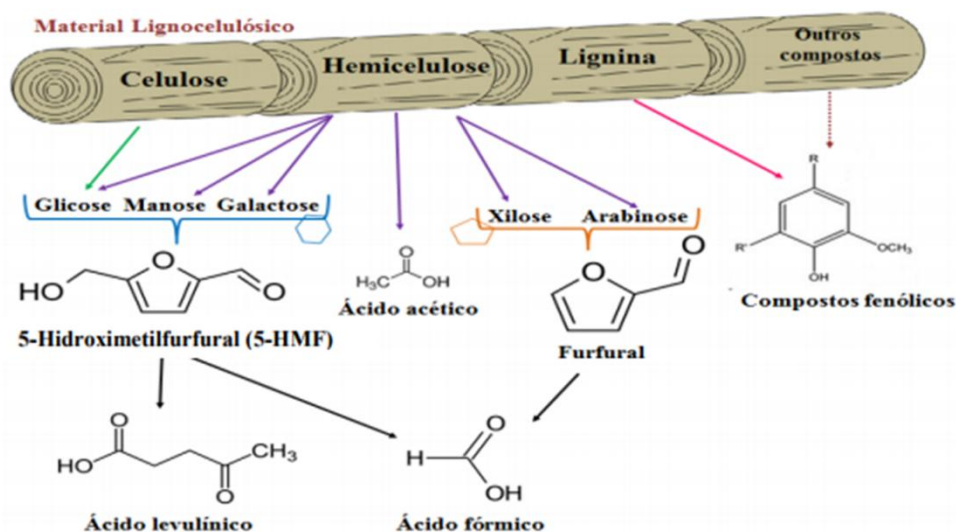
3.3.3 Formação de inibidores

As etapas de pré-tratamentos são determinantes para a eficiência e otimização das etapas futuras de sacarificação e fermentação. No entanto as etapas de pré-tratamentos com hidrólise de polissacarídeos também conduzem à formação de produtos de degradação do açúcar (Figura 10), nomeadamente inibidores, tais como furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF) (NEUREITER *et al.*, 2002), como também aldeídos fenólicos e ácidos orgânicos fracos (BALAN, 2014).

A hidrólise ácida diluída resulta em subprodutos que atuam como inibidores do crescimento microbiano (WALTON; VAN HEININGEN; VAN WALSUM, 2010). Os subprodutos principais são: ácido acético que resulta da hidrólise de grupos acetil ligados aos monómeros hemicelulósicos, e furfural, que é gerado como produtos de degradação oxidativa de açúcares de pentose como xilose (JONSSON e MARTIN, 2016). Alguns produtos fenólicos solúveis também são gerados a partir de oxidação catalisada por ácido de açúcares de pentose (TIZAZU e MOHOLKAR, 2017).

Os produtos de degradação não só reduzem os rendimentos de monômeros de açúcar, mas também atuam como inibidores de fermentação. Para produzir hidrolisados fermentáveis e evitar uma alta perda de rendimento de açúcar, é necessário escolher condições de reação que mantenham a geração de inibidores em um nível mais baixo (CHEN, YE e SHEEN, 2012).

Figura 10 - Esquema geral dos principais inibidores gerados a partir do material lignocelulósico durante o pré-tratamento ácido.



Fonte: Adaptado de JONSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT (2013).

A existência de compostos inibidores leva à redução da atividade da celulase e ao baixo crescimento e/ou metabolismo celular de fermentação (KOPPRAM *et al.*, 2014). Derivados de furanos, tais como o furfural e o 5-hidroximetilfurfural podem diminuir o crescimento e a produtividade da célula por afetar a glicólise pela inibição de enzimas desidrogenases, bem como, em alguns casos, alterar a ação das enzimas álcool, aldeído e piruvato desidrogenase (VAN DER POL, 2014).

3.4 Sacarificação (hidrólise enzimática)

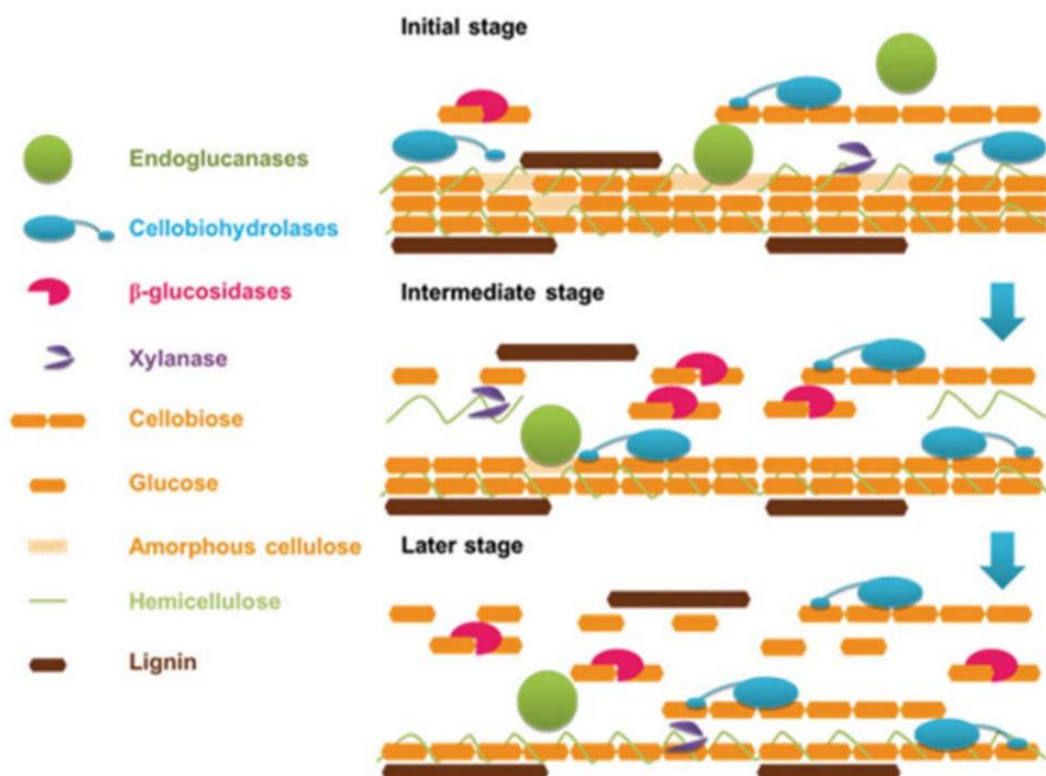
O processo de produção do etanol 2G começa com o pré-tratamento químico da biomassa, no qual os componentes lignocelulósicos são separados. Posteriormente, a celulose é encaminhada para a segunda etapa, a hidrólise enzimática, momento em que um coquetel de enzimas é utilizado para obter a glicose. O uso de celulases para obtenção de açúcares fermentescíveis originados de materiais lignocelulósicos tem sido amplamente explorado em diversos estudos (FALKOSKI *et al.*, 2013; ANNAMALAI *et al.*, 2014; LAOTHANACHAREON *et al.*, 2015; SAINI *et al.*, 2015).

A sacarificação compreende, portanto, a decomposição da celulose em glicose, e exige uma combinação de complexos enzimáticos de celulases, as quais podem ser classificadas em três grupos: endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidases (SANTOS *et al.*, 2017). Essas enzimas são produzidas principalmente por microorganismos, como fungos e bactérias, e atuam sinergicamente para clivagem de ligações β -1,4-glicosídicas em cadeias de celulose em condições suaves e com alta especificidade (BINOD *et al.*, 2011; SAINI *et al.*, 2015). A maioria das celulases comercialmente utilizadas são produzida pelas espécies *Trichoderma* e *Aspergillus*.

As celulases são classificadas, portanto, de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico (CASTRO e PEREIRA JR., 2010). As endoglucanases são enzimas do complexo celulolítico responsável por iniciar a hidrólise, e agem na região interna da fibra de celulose (Figura 11), liberando compostos menores formados por poucas unidades de glicose, os chamados oligossacarídeos. As exoglucanases agem nas extremidades das fibras de celulose, as quais promovem quebras gerando a celobiose (SRIVASTAVA *et al.*, 2017). A celobiose contém duas moléculas de glicose ligadas, e as β -glucosidases por sua vez agem separando estas ligações, gerando, portanto, o açúcar disponível para fermentação (XUE, WANG, YAO, 2015).

A sacarificação enzimática da biomassa lignocelulósica é, portanto, o método mais eficiente para a obtenção dos açúcares. Contudo, o processo de sacarificação ainda é oneroso, sendo considerado um dos maiores desafios na obtenção do etanol celulósico (IDRIS, PANDEY, RAO, 2017).

Figura 11 - Ação das celulases sobre a molécula de celulose.



Fonte: DU *et al.* (2013).

3.5 Fermentação

Após as etapas de pré-tratamento que aumentam a digestibilidade da celulose, e da sacarificação que visa recuperar os açúcares fermentáveis do material pré-tratado, ocorre a fermentação, na qual os açúcares serão convertidos em etanol (REVIN, ATYKYAN, ZAKHARKIN, 2016) usando uma variedade de microrganismos (SAKIMOTO, KANNA, MATSUMURA, 2017).

A biomassa lignocelulósica é composta tanto de hexoses, açúcares de seis carbonos (C_6) como a glicose, a manose e a galactose, quanto de pentoses, açúcares de cinco carbonos

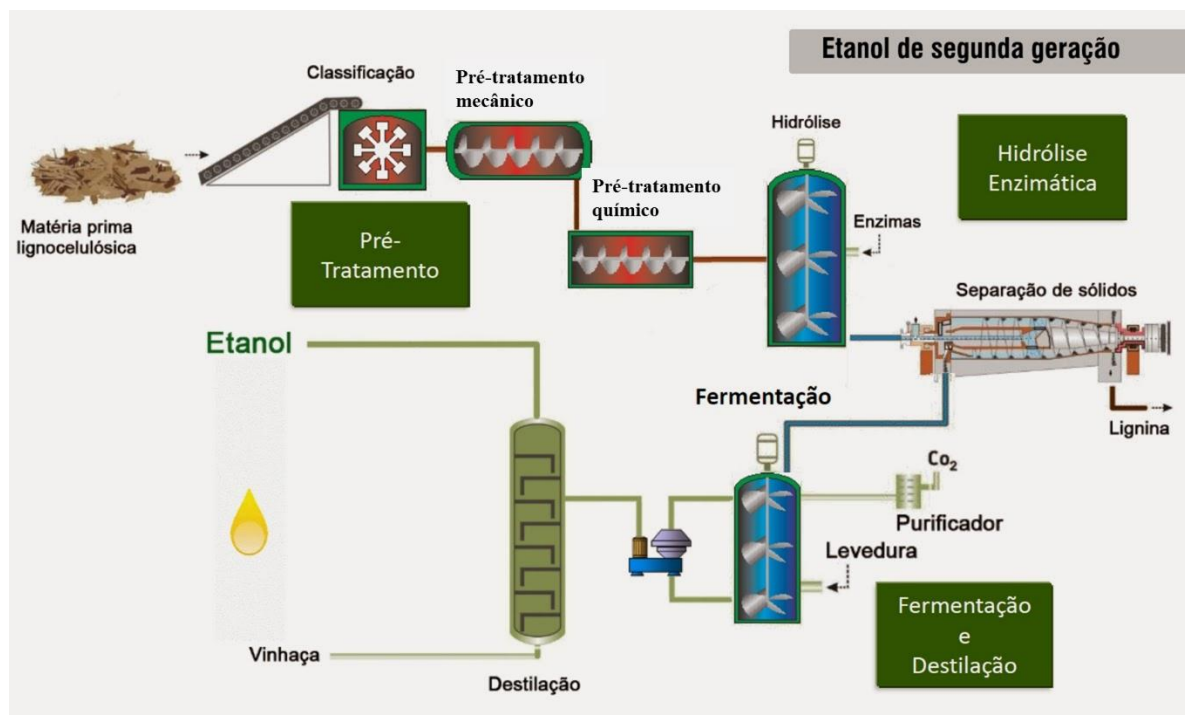
(C₅) como a xilose e arabinose, e o processo de fermentação envolve a conversão destes açúcares em etanol (MUPONDWA *et al.*, 2017b).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é utilizada na maioria das fermentações industriais (KUILA e SHARMA, 2016), devido principalmente à sua capacidade de gerar altas taxas de fermentação com etanol; resistência à alta pressão osmótica, baixa tolerância ao pH e tolerância a produtos inibitórios (MUPONDWA *et al.*, 2017b). No entanto a *S. cerevisiae* é incapaz de metabolizar naturalmente pentoses, sendo esses açúcares fermentados a etanol por relativamente poucas linhagens nativas e geralmente com baixos rendimentos (BERŁOWSKA *et al.*, 2016).

Em relação à fermentação de pentoses, as espécies de leveduras mais promissoras identificadas até o momento são *Candida shehatae*, *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* e *Pachysolen tannophilus* (BIDEAUX *et al.*, 2016; FARIAS; ATALA; MAUGERI FILHO, 2017; KUHAD *et al.*, 2011). Os baixos rendimentos de conversão de pentoses em etanol podem ser devido à presença de hexoses, que competem ou inibem a utilização da xilose, além do fato das leveduras fermentadoras de pentose não serem suficientemente tolerantes ao etanol originado dos açúcares de seis carbonos (HARNER *et al.*, 2015).

A conversão da biomassa lignocelulósica em etanol requer, portanto, microrganismos que realizem de forma eficiente a fermentação dos diversos açúcares, pois assim seria possível otimizar a biorrefinaria celulósica. O esquema resumido da produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica é representado na Figura 12.

Figura 12 - Representação esquemática da produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica.



3.6 Sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench)

A cultura do sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) pode ser considerada recentemente introduzida no país quando comparada à outras culturas, como a cana-de-açúcar, pois a partir de esforços de institutos de pesquisa e universidades, sobretudo a partir da década de 1950 é que essa espécie ganhou alguma expressão. Com isso, a Embrapa iniciou um programa de melhoramento de sorgo em meados da década de 1970, acreditando no potencial da cultura no país (PURCINO, 2011). Hoje de acordo com a estimativa da CONAB (2018), a área plantada de sorgo no Brasil é de aproximadamente 782,2 mil hectares, com produtividade de 2.731 Kg ha⁻¹ de grãos.

Destaca-se que a área cultivada com sorgo no Brasil ainda tem baixa representatividade, principalmente pelo baixo investimento financeiro e baixa tecnologia empregada no seu cultivo (CONAB, 2018), embora o potencial genético e o nível de conhecimento tecnológico sobre a cultura sejam altos e disponibilizado por parte das entidades de pesquisa.

3.6.1 Origem e classificação botânica

Pertencente à família Poaceae, gênero *Sorghum*, espécie cultivada *Sorghum bicolor* (L.) Moench, o sorgo provavelmente tem origem na África, embora algumas evidências indiquem que possa ter havido duas regiões de dispersão independentes: África e Índia (RIBAS, 2007). De acordo com BNDES (2011), por ser uma cultura tolerante à baixa umidade, o sorgo vem sendo utilizado como segunda safra, onde o clima é mais seco, existindo ainda a possibilidade de outra safra anual. No Brasil, o sorgo tem sido usado na safrinha, na região Centro-Oeste. Por ser o quinto cereal mais produzido no mundo, atrás apenas do arroz, trigo, milho e cevada, sua maior área de cultivo localiza-se na África, enquanto a maior produção está na América do Norte (México e EUA) (CONAB, 2016).

3.6.2 Ecofisiologia e descrição morfológica

O sorgo é uma planta autógama, com baixa taxa de fecundação cruzada. É uma espécie diplóide com 10 pares de cromossomos ($2n=2x=20$) no seu genoma (SANTOS *et al.*, 2005). A taxa de polinização cruzada na cultura é pequena e variável, conforme o genótipo e o ambiente (em torno de 2% a 10%, podendo atingir 60% em panículas abertas) e, quando ocorre, é realizada pelo vento (SMITH e FREDERIKSEN, 2000). A planta do sorgo é formada por:

Sistema Radicular: Os tipos de raízes encontrados no sorgo são: primárias ou seminais, secundárias e adventícias (MAGALHÃES, SOUZA, SCHAFFERT, 2015). Sua profundidade pode alcançar até 1,5 m (sendo 80% até 30 cm de profundidade no solo), e em extensão lateral até 2,0 m. O crescimento das raízes em geral termina antes do florescimento, pois nessa fase a planta passa a priorizar as partes reprodutivas (panículas), as quais apresentam grande demanda por fotoassimilados. O sistema radicular do sorgo é mais extenso, fibroso e possui maior número de pelos absorventes do que o milho. Comparando-se as raízes primárias dessas duas culturas, ambas apresentam basicamente a mesma quantidade de massa radicular, no entanto, as raízes secundárias do sorgo são, no mínimo, o dobro daquelas encontradas no milho (PEREIRA FILHO E RODRIGUES, 2015).

Um sistema radicular eficiente, como é o caso do sorgo, permite que as plantas respondam rapidamente ao ambiente em que elas vivem, tornando-as mais adaptáveis às mudanças ambientais, principalmente em relação ao estresse hídrico e a disponibilidade de nutrientes do solo (MAGALHÃES, NEGRI, SOUSA, 2013).

A tolerância a seca é uma característica complexa, a qual envolve morfologia, fisiologia e bioquímica. Três mecanismos são relacionados a seca: resistência, tolerância e escape. A cultura do sorgo apresenta o escape e a tolerância. O escape através de um sistema radicular profundo e ramificado o qual é eficiente na extração de água do solo. Já a tolerância está relacionada ao nível bioquímico (MAGALHÃES, SOUZA, SCHAFFERT, 2015). A característica bioquímica permite a planta desacelerar seu metabolismo fisiológico (hibernar), durante o período com déficit hídrico (MAGALHÃES *et al.*, 2010), e tem um poder extraordinário de recuperação quando o estresse é interrompido (MAGALHÃES, SOUZA, SCHAFFERT, 2015).

Caule: O caule do sorgo é um colmo, dividido em nós e entre nós. Normalmente a planta de sorgo apresenta apenas um colmo, porém, a depender do tipo de sorgo, da variedade e das condições ambientais, esta planta pode apresentar perfilhos ou afillhos. O diâmetro do colmo varia nos mais diversos tipos de sorgo de 5 a 30 mm na sua base. São colmos cheios, mais ou menos duros e se apresentam bastante adocicados no tipo sacarino. A altura do caule até o extremo da panícula varia segundo o número e a distância dos entrenós e também segundo o pedúnculo e a panícula. A quantidade de nós está determinada pelos genes da maturação e por sua reação ao fotoperíodo e a temperatura (MAGALHÃES, SOUZA, SCHAFFERT, 2015).

Folhas: As folhas são eretas quando novas, tendendo para horizontalidade quando amadurecem. São alternadas, lanceoladas, com bordos serrilhados, apresentando-se lisas e com uma camada de cerosidade. Os estômatos se localizam em ambos os lados da folha. A nervura central é saliente, convexa no lado de baixo e côncava no lado de cima da folha. A última folha é chamada de bandeira e sua bainha protege a inflorescência que está emergindo. A folha se divide em duas partes: a bainha e o limbo foliar (MAGALHÃES, SOUZA, SCHAFFERT, 2015). Os fatores que determinam o número de folhas no sorgo são: cultivar, fotoperíodo e temperatura (CLERGET *et al.*, 2008).

Inflorescência: A inflorescência do sorgo é uma panícula, com flores andróginas. As flores na panícula desenvolvem-se sucessivamente do topo para a base (demora de 4 a 5 dias) (MAGALHÃES, SOUZA, SCHAFFERT, 2015). Como nem todas as plantas num campo de sorgo florescem ao mesmo tempo, a duração do florescimento no campo pode variar de 6 a 15 dias. Existem mais de 5000 grãos de pólen por antera na maioria dos híbridos e variedades, o que equivale dizer que há mais de 20 milhões de grãos de pólen por panícula.

O ciclo fenológico do sorgo pode ser dividido em três fases (MAGALHÃES, DURÃES, RODRIGUES, 2010): *i*) vegetativa (EC1), primeira fase de crescimento da cultura, que vai do plantio até a iniciação da panícula; *ii*) reprodutiva (EC2), compreende a iniciação da

panícula até o florescimento; *iii*) maturação dos grãos (EC3), vai da floração à maturação fisiológica, englobando a polinização, fertilização, desenvolvimento e maturação do grão (MAGALHÃES, SOUZA, SCHAFFERT, 2015).

O sorgo é uma planta C4, sensível ao fotoperíodo, de dia curto e com altas taxas fotossintéticas (CARRILLO *et al.*, 2014). Para que a cultura alcance um bom desenvolvimento, a maioria das cultivares necessitam de temperaturas superiores a 21°C. A planta de sorgo apresenta uma maior tolerância ao déficit de água e ao excesso de umidade no solo do que a maioria dos outros cereais, e pode ser cultivada numa ampla faixa de condições de solo (MAGALHÃES *et al.*, 2010).

Em relação à demanda nutricional, o sorgo apresenta um alto rendimento mesmo com baixo fornecimento de adubação e, quando comparado ao milho, pode requerer até 30% menos fertilizantes nitrogenados para produzir a mesma quantidade de etanol por hectare em condições não irrigadas (DAMASCENO *et al.*, 2014). Além da grande adaptabilidade edafoclimática apresentada pela planta do sorgo, as diversas cultivares dessa planta podem ser utilizadas nas diferentes cadeias produtivas.

3.6.3 Tipos de sorgo

Existem cinco tipos comerciais de sorgo, sendo eles o granífero, o forrageiro, o sacarino, o vassoura e o biomassa. Os tipos granífero e forrageiro são empregados principalmente na alimentação animal. O sorgo granífero é uma planta de porte baixo a médio (entre 1,20 m e 1,50 m), onde o principal produto de exploração são os grãos que ficam na panícula ou cacho, os quais são colhidos quando estão secos ou duros (PEREIRA FILHO E RODRIGUES, 2015). De acordo com Silva *et al.* (2015), em termos mercadológicos, o cultivo de sorgo granífero em safrinha, principalmente em sucessão à cultura da soja, tem contribuído para a oferta sustentável de grãos de baixo custo para a agroindústria de rações.

O sorgo forrageiro é uma planta de porte médio a alto (entre 2,0 m e 3,0 m), podendo ser utilizado como o sorgo forrageiro silageiro e/ou sorgo forrageiro para corte e/ou pastejo (PEREIRA FILHO E RODRIGUES, 2015). A possibilidade de oferta de silagem de alta qualidade por meio do cultivo de sorgo forrageiro contribui para um programa sustentável da pecuária nacional (PARRELLA *et al.*, 2014).

O sorgo vassoura apresenta como característica principal a panícula laxa de ráquis curta e longas ramificações (FARIAS, 1989), o que a torna propícia para a fabricação de vassouras e também como produto artesanal (PEREIRA FILHO E RODRIGUES, 2015). O uso

do sorgo vassoura é indicado como uma atividade alternativa para gerar renda voltada para a agricultura familiar, produzindo as vassouras conhecidas popularmente, em algumas regiões do Brasil, como vassoura de melga (FAVARATO *et al.*, 2011).

No entanto, dois tipos têm-se destacado no cenário das culturas energéticas, sendo eles o sacarino e o biomassa. Esses sorgos apresentam grande potencial para a produção de biocombustíveis, em especial na cadeia produtiva do etanol, contribuindo para o crescimento da agricultura de energia do país.

O tipo de sorgo sacarino assemelha-se à cana-de-açúcar por apresentar colmos suculentos com açúcares diretamente fermentescíveis, produzindo assim o etanol de primeira geração (PARRELLA *et al.*, 2010a), podendo, portanto, utilizar da mesma infraestrutura de processamento da cana-de-açúcar. Tem também como vantagem a possibilidade de ser cultivado na entressafra da cana, ampliando o número de dias trabalhados por ano nas destilarias, principalmente com o fornecimento de matéria-prima nos meses de março e abril, aumentando a viabilidade econômica de produção do etanol (PARRELLA *et al.*, 2014).

Por fim, o sorgo biomassa é uma alternativa para o fornecimento de matéria-prima para o mercado de bioenergia, tanto na forma de biocombustível líquido com a produção de etanol de segunda geração, quanto na cogeração de energia (SIMEONE *et al.*, 2017) por meio da queima direta de biomassa. Esse tipo apresenta grande porte, podendo chegar a 6 metros (EMBRAPA, 2014). É uma cultura totalmente mecanizável (do plantio a colheita), estabelecida por sementes, além de haver sistemas de produção agrícola bem conhecidos (PARRELLA *et al.*, 2011).

Como característica principal desse tipo de sorgo tem-se a alta produção de biomassa, o qual de acordo com Parrella *et al.* (2010b) corresponde ao potencial de produzir mais de 50 t ha⁻¹ de matéria seca por ciclo (seis meses). Isso é possível pelo fato de o sorgo biomassa ser um tipo mais sensível ao fotoperíodo, florescendo apenas quando os dias possuem menos de 12 horas e 20 minutos. Portanto, quando semeado nos meses de outubro a dezembro, época em que o fotoperíodo é maior que 12 horas e 20 minutos, ele apenas iniciará o desenvolvimento da gema floral a partir de 21 de março do ano seguinte, ampliando o ciclo vegetativo, e, simultaneamente, possibilitando maior produção de biomassa por hectare/ciclo, em comparação a cultivares insensíveis ao fotoperíodo (PARRELLA *et al.*, 2014).

Além das vantagens supracitadas, o sorgo biomassa também apresenta uma composição química considerada inicialmente adequada, pois, objetivando a produção do etanol de segunda geração, além da necessidade de uma alta produtividade de biomassa seca, a matéria-prima utilizada deve apresentar composição centesimal favorável aos processos

químicos posteriormente empregados na obtenção do bioetanol. De acordo com Damasceno *et al.* (2010), as características químicas da biomassa têm influência direta no processo de conversão de energia, sendo que a produção de biocombustíveis lignocelulósicos envolve a despolimerização dos polissacarídeos da parede celular (celulose e hemicelulose) em açúcares simples e fermentáveis, pelos processos de pré-tratamento e sacarificação, e conversão de açúcares simples em biocombustíveis pela fermentação (REIS *et al.*, 2016).

Dessa forma, a biomassa do sorgo, de elevada adaptabilidade, apresenta elevado teor de fibras, além de quantidades significativas de açúcares fermentescíveis, que pode ser explorada em larga escala (SANTOS *et al.*, 2014). Todavia, os genótipos de sorgo têm uma grande variação, em relação ao conteúdo da parede celular, principalmente em relação a lignina (DAMASCENO *et al.*, 2016). Alelos denominados *bmr* “*Brown midrib*”, que conferem o fenótipo de nervura marrom à planta, são os responsáveis por expressar os baixos teores de lignina (PEDERSEN *et al.*, 2005).

Em sorgo, plantas mutantes “*Brown midrib*” (*bmr*) foram obtidas através de indução química com dietil sulfato (PORTER *et al.*, 1978), mas também, em 1989, foram identificados quatro mutantes “*Brown midrib*” de sorgo de ocorrência natural na Malásia (GUPTA, 1990). Portanto, os materiais de sorgo biomassa de nervura marrom *bmr* apresentam essa característica, que difere em qualidade e quantidade, em relação a composição da parede celular e digestibilidade da fibra vegetal, quando comparada aos materiais normais (SATTTLER *et al.*, 2010; CHERNEY *et al.*, 1991).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aquisição da matéria prima

Os híbridos avaliados foram desenvolvidos pelo programa de melhoramento genético da Embrapa Milho e Sorgo, localizada na cidade de Sete Lagoas, Minas Gerais.

Foram avaliados cinco híbridos de sorgo biomassa, todos sensíveis ao fotoperíodo, sendo quatro experimentais (201556B002, 201556B003, CMSXS7027 e CMSXS7016), e um comercial (BRS 716), dos quais os dois primeiros são híbridos experimentais de nervura marrom *bmr*.

4.2 Instalação e condução do experimento

Os trabalhos foram executados em duas etapas, sendo a primeira em campo e a segunda em laboratório.

Os campos experimentais foram conduzidos em duas regiões distintas do Estado de Minas Gerais, Brasil. Uma das regiões foi o município de Sete Lagoas, na área experimental da Embrapa Milho e Sorgo (-19°28'57'' S e 44°15'08'' W), a 732 m de altitude. O Alto Vale do Jequitinhonha foi a outra região, com ensaios conduzidos na Fazenda Experimental Rio Manso da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (18°04'S e 43°28'W), localizada no município de Couto de Magalhães de Minas, a 733 m de altitude.

O clima das duas regiões, segundo classificação de Köppen, é do tipo Aw, com estação seca de maio a outubro e úmida de novembro a abril. Em Sete Lagoas a temperatura média anual é de 23 °C, com período chuvoso de outubro a março, com índice pluviométrico médio anual de 1403 mm (INMET, 2018). No município de Couto de Magalhães de Minas, a precipitação máxima ocorre de novembro a janeiro, com temperatura média anual de 19,4 °C, e com índice pluviométrico médio anual de 1269 mm (CPRM, 2004). O solo das duas áreas experimentais foi classificado como Latossolo Vermelho Amarelo (Embrapa, 2006).

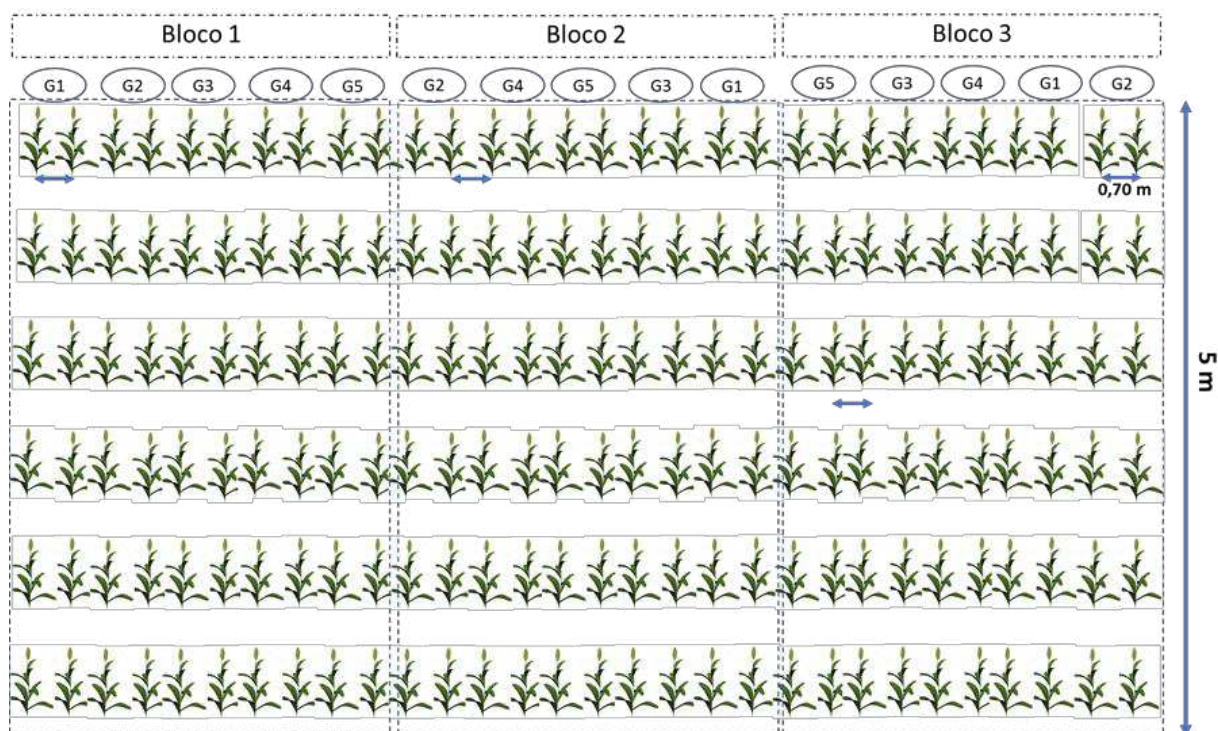
O preparo do solo da área experimental em cada local foi feito mediante aração e gradagem de um a dois dias antes da semeadura. Logo após, foram feitos os sulcos de plantio para posterior adubação de plantio e semeadura manual. Os experimentos foram conduzidos em condições de sequeiro. O controle das plantas daninhas foi efetuado mediante aplicação do herbicida Atrazina® com a complementação via capina manual. Os demais tratamentos culturais

relacionados com o controle de pragas e doenças foram realizados seguindo o recomendado para a cultura na região.

Para efeito de comparação de dados agronômicos, foram conduzidos plantios em dois anos agrícolas. Na safra 2015/2016, em Sete Lagoas, o cultivo do sorgo ocorreu no período de 26/11/2015 a 17/05/2016. Em Couto de Magalhães de Minas, o plantio foi realizado no dia 10/12/2015 e a última colheita ocorreu no dia 09/05/2016. Na safra 2016/2017, em Sete Lagoas, o período de cultivo foi de 20/12/2016 a 10/05/2017, enquanto em Couto de Magalhães de Minas o cultivo ocorreu no período de 29/11/2016 a 04/05/2017.

Em ambos os ambientes, foi adotado um delineamento em blocos ao acaso (DBC), consistindo de cinco parcelas com duas linhas de cinco metros cada, espaçadas em 0,7 m (Figura 13). Três repetições foram usadas para cada parcela. O material foi semeado de forma manual ao longo da linha, e, aos 21 dias, após a emergência, realizou-se o desbaste, deixando aproximadamente 40 plantas por fileira, prevendo um estande de 140.000 plantas por hectare aproximadamente (8 plantas por metro linear). Procedeu-se a adubação de plantio na dose de 400 kg ha⁻¹ de NPK (08-28-16) e adubação de cobertura com 80 kg ha⁻¹ de N, quando as plantas estavam com 4-6 folhas definitivas.

Figura 13 – Croqui experimental de campo.



Fonte: *Próprio autor, 2019.*

Os materiais após a colheita foram encaminhados para o Laboratório de Bioprocessos e Biotransformação, localizado no *Campus JK* da UFVJM, e aos laboratórios de Composição Centesimal da Embrapa Milho e Sorgo, onde foram conduzidas às análises.

4.3 Caracteres avaliados na colheita

Por ocasião da colheita, foram avaliadas as seguintes características agrônômicas:

1. Estande final – número de plantas na área útil de cada parcela.
2. Florescimento – observado o número de dias decorridos do plantio até o ponto em que 50% das plantas da parcela se apresentaram em florescimento.
3. Altura de planta – obtida a partir da altura média (m) de dez plantas tomadas aleatoriamente da área útil da parcela (Figura 14, letra b). A aferição foi feita com régua medindo-se da superfície do solo ao ápice da panícula.
4. Peso de massa verde total (PMV) – Foram cortadas as plantas da área útil da parcela a 10,0 cm da superfície do solo. Logo após realizou-se a pesagem (kg) dos colmos mais folhas com auxílio de balança digital de suspensão (capacidade 200 kg) (Figura 14, letra c).
5. Peso de matéria seca total (PMS) – Foram utilizadas plantas inteiras selecionadas ao acaso, com panículas, para determinar a matéria seca. Esse material após ser processado e picado em um desintegrador (Figura 14, letra d) foi colocado em sacos de papel previamente pesados, em porções variadas e pesadas, constituindo, assim uma amostragem. Em seguida, o material foi seco em estufa de circulação de ar forçada a 65 °C até peso constante (Figura 14, letra e). O resultado obtido foi utilizado para a determinação da produção de matéria seca/ha. Posteriormente, esse material foi moído em moinho de faca (Figura 14, letra f), em peneira de 2,0 mm, e armazenado em sacos plásticos para serem destinados as futuras análises (Figura 14, letra g).

Figura 14- Colheita e processamento do sorgo biomassa na safra 2015/2016.



a= observação da altura das plantas de sorgo biomassa em campo; b= medição das plantas; c= pesagem das plantas inteiras, massa verde, em campo; d= desintegrador; e= secagem das plantas para posterior obtenção do peso de massa seca; f= moagem do sorgo; g= biomassa de sorgo moída. Fonte: *Próprio autor, 2017.*

4.4 Caracterização físico-química da biomassa do sorgo – análise centesimal

A biomassa do sorgo, previamente moída, foi submetida às seguintes análises:

4.4.1 Umidade

O teor de umidade foi determinado de acordo com as normas analíticas do Instituto Adolph Lutz (IAL, 2008). Foram pesados 3,0 g de amostra em placas de vidro, previamente desumidificadas em estufa a 105 °C. As amostras foram mantidas em estufa a 105 °C, até peso constante. O resultado foi calculado segundo a fórmula abaixo e expresso em porcentagem de umidade. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

$$U = \frac{(P_{mi} - P_{mf})}{P_{mi}} \times 100$$

U = teor de umidade, em porcentagem

P_{mi} = massa (g) do vidro com amostra inicial

Pmf = massa (g) do vidro com massa final (massa seca)

4.4.2 Cinzas

O teor de cinzas foi determinado a partir de 0,5 g de amostra contida em cadinho de porcelana, previamente calcinado em mufla a 550 °C e com peso conhecido. As amostras foram previamente carbonizadas e em seguida incineradas em mufla a 550 °C. Após completa incineração, os cadinhos contendo as amostras foram resfriados em dessecador e pesados. Os resultados são expressos em g/100g de matéria integral. A determinação foi calculada de acordo com a seguinte fórmula (IAL, 2008):

$$C = \frac{(M - P)}{A} \times 100$$

C = teor de cinzas em porcentagem

M = massa do cadinho com cinzas (g)

P = massa do cadinho vazio (g)

A = massa da amostra (g)

4.4.3 Fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA)

As análises de fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido foram determinadas segundo método Ankon (2006).

Identificou-se os saquinhos Filter bag F57 com o número da amostra utilizando lápis 6B, e posteriormente obteve-se o peso de cada saquinho (TFDN). Cerca de 0,450 g a 0,550 g de amostra foi transferido para o saquinho, registrando-se o peso total (PamFDN). Fechou-se o saquinho em selador. A distância da borda recomendada é de 4 mm. Incluiu-se um saquinho vazio como amostra branco para determinação do fator de correção (C1). Colocou-se os saquinhos no suporte alternadamente, com no máximo de 24 saquinhos. Adicionou-se 1900 mL a 2000 mL da solução de detergente neutro à temperatura ambiente no extrator de fibras. A temperatura de extração foi de 95 °C. No equipamento EQ LCC 07 foi selecionado a agitação 4. O tempo de extração foi de 75 min após atingir a temperatura desejada. Ao final da extração, drenou-se a solução de detergente neutro diretamente na pia, e adicionou-se 1900 mL a 2000mL de água deionizada, a 95 °C e agitou-se por 5 min. Repetiu-se a etapa de lavagem mais duas vezes, totalizando 3 enxagues. Em seguida as amostras foram removidas do extrator de fibras retirando-se o excesso de água pressionando os saquinhos. Posteriormente as amostras foram

colocadas em béquer e adicionou-se acetona, deixando-as imersas por 5 min para remover o excesso de água. O béquer utilizado nesta etapa acomodou adequadamente as amostras e a acetona. Após retirar a acetona, as amostras foram secas na capela de exaustão de gases até remoção completa da acetona, no tempo mínimo de 20 minutos. Finalmente as amostras foram secas em estufa a $102\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 4 h ou pernoite, e posteriormente colocadas no dessecador, deixando-as esfriar até temperatura ambiente. Ao final pesou-se as amostras (PFDN).

O teor de fibras em detergente neutro foi expresso em % de FDN/g de torta íntegra, calculada usando a fórmula a seguir:

$$FDN(\%) = \frac{100 \times (PFDN - TFDN)}{PamFDN} \times 100$$

FDN = teor de fibra em detergente neutro, em porcentagem.

PFDN = peso do saquinho com resíduo depois de lavado e seco (g)

TFDN = peso do saquinho vazio (g)

PamFDN = peso da amostra mais peso do saquinho (g)

Para obter a fibra em detergente ácido repete-se todo o processo descrito para a fibra em detergente neutro, utilizando-se, contudo, a solução de detergente ácido.

4.4.4 Celulose, hemicelulose e lignina

Assim como citado por Silva e Queiroz (2002), a metodologia utilizada para determinar as frações de celulose, hemicelulose e lignina foi o método proposto por Van Soest (1965). Após determinação da FDN, constituída por celulose, hemicelulose e lignina, e determinação da FDA composta por lignina e celulose, a hemicelulose foi obtida apenas pela diferença entre as duas frações. Por fim, a celulose foi determinada pela diferença entre as frações de FDA e lignina ácida.

Procedimento para a extração da lignina: Os saquinhos Filter bag F57 foram identificados com o número da amostra resultante da determinação de FDA. Após a determinação da FDA, colocou-se os saquinhos secos contendo a amostra em béquer e adicionou 10 mL/saquinho de H_2SO_4 72 %. O béquer deve ser de tamanho suficiente para o ácido cobrir as amostras. Colocou-se um bequer menor dentro do outro béquer para agitar e assegurar que as amostras ficassem submersas no ácido. As amostras ficaram submersas no

ácido por 3 h, agitando-se no início e a cada 30 min. Cada agitação é feita subindo e descendo o béquer por 30 vezes. Após as 3 h lavou-se as amostras com água deionizada, repetindo-se as lavagens até pH neutro (pH = 7). Após escorrer a água de lavagem, pressionando os saquinhos, colocou-se as amostras em um béquer seco e adicionou acetona suficiente para cobrir as amostras (cerca de 250 mL) e deixou-as imersas por 5 min para remover o excesso de água. O béquer utilizado nesta etapa acomodou adequadamente as amostras e a acetona. As amostras foram colocadas para secar na capela de exaustão de gases até remoção completa da acetona, no mínimo por 20 minutos. Em seguida as amostras foram colocadas em estufa a $102\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 4 h. As amostras retiradas da estufa foram colocadas no dessecador para esfriar até temperatura ambiente, prosseguindo-se com a pesagem (PLIG). Posteriormente as amostras foram colocadas em cadinhos previamente tarados (TCZLIG), e levados para mufla a $525\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 h. Após retirar os cadinhos da mufla contendo as cinzas (PCZLIG), realizou-se a pesagem, (ANKON, 2006).

$$\text{Lignina}(\%) = \frac{100 \times (\text{CADResíduo} - \text{FDA})}{\text{PamFDA}} \times 100$$

$$\text{CADResíduo} = \text{PLIG} - (\text{PCZLIG} - \text{TCZLIG})$$

Lignina (%) = teor de lignina, em porcentagem.

FDA = teor de fibra em detergente neutro

PamFDA = peso da amostra mais peso do saquinho (g) de FDA

PLIG = peso da amostra após extração com H_2SO_4

PCZLIG = peso dos cadinhos com as cinzas

TCZLIG = peso dos cadinhos tarados

Somente a composição lignocelulósica foi avaliada nas duas safras, sendo o restante das análises realizadas com a biomassa obtida na safra 2015/2016.

4.5 Pré-tratamentos e Sacarificação

Os pré-tratamentos e sacarificação foram realizados com a biomassa obtida na safra 2015/2016. Foram utilizadas condições otimizadas por LANGBEHN *et al.*, 2013, 2014.

As condições utilizadas nas etapas de pré-tratamento ácido, para 75,0 g de amostra foram com razão sólido/ líquido (S/L) de 20%, concentração de ácido sulfúrico (H_2SO_4) de 4% e mantida em autoclave a 121°C e pressão de 1 atm por 30 minutos. Nessa etapa extrai-se a hemicelulose da biomassa. Ao final da hidrólise com ácido sulfúrico, o resíduo sólido foi recuperado por filtração à vácuo e lavado com água destilada até atingir pH neutro. O resíduo pré-tratado foi então seco em estufa a 65°C por 48 horas, pesado e armazenado. A fração solúvel recuperada após a hidrólise ácida foi analisada quanto ao teor de açúcares redutores L-arabinose, D-xilose, D-glicose, ácido acético, furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF) e glicerol também foram determinados no hidrolisado. Esta quantificação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, (HPLC - High Performance Liquid Chromatography), com uso do sistema Shimadzu Prominence UFLC 20A, equipado com coluna Rezex ROA-Shodex® (300 x 7.5 mm) mantida a 60°C e uso de H_2SO_4 0,0025 mol L^{-1} como eluente a $0,6 \text{ mL min}^{-1}$. As amostras foram injetadas de forma automatizada em volumes de 5 μL . A detecção por índice de refração foi usada para a determinação dos monossacarídeos, glicerol e ácido acético. A detecção espectrofotométrica foi usada para as determinações do furfural e HMF a 254 nm. Padrões externos foram usados para as determinações qualitativas e quantitativas.

Para o pré-tratamento alcalino, com o objetivo de extrair a lignina, foi utilizado solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 7,0% e temperatura a $85,2^\circ\text{C}$, sob um tempo de reação de 12 horas para cada 28,0 g de amostra previamente tratada com ácido. Após o pré-tratamento o hidrolisado foi filtrado sob vácuo. O resíduo sólido foi lavado com água destilada até atingir pH neutro, seco em estufa a 65°C por 48 horas, pesado e armazenado.

Para a sacarificação foram usados FPU 150 μL de celulase comercial (Celluclaste-Novozymes ®) por grama de biomassa vegetal, na razão sólido-líquido de 10%. O meio reacional foi mantido em incubadora Shaker a 50°C com agitação de 150 rpm por 72 h.

4.6 Fermentação

O microrganismo utilizado para a fermentação foi a *Saccharomyces cerevisiae*, (FLEISCHMANN®) levedura comercialmente disponível, na forma desidratada, para a fermentação de hexose, na concentração de 2%. O processo fermentativo ocorreu em frascos com tampa de rosca com capacidade de 50 mL a 30°C , em condição estática até 24 h. Realizou-se duas etapas distintas de fermentação, sendo a primeira com a biomassa tratada com ácido seguido de base, e a segunda com a biomassa tratada somente com ácido. Foram utilizados fermentômetros para o acompanhamento do desprendimento de CO_2 por gravimetria. Foi

analisado o consumo dos açúcares (glicose, açúcar redutor (AR)) e quantificado o etanol produzido.

4.7 Variáveis de resposta do processo fermentativo

4.7.1 Quantificação de açúcares redutores (AR)

Os teores de açúcares (AR) foram determinados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959). A quantificação foi realizada em microtubo tipo Eppendorf de 2 mL, pela adição de 100 µL da amostra e 100 µL do reagente DNS, seguidos de incubação a 100 °C por 5 minutos e adição de 1,0 mL de água. Após homogeneização foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 540 nm.

A curva analítica foi preparada utilizando D-glicose como padrão nas concentrações de 0 a 0,1 mg/mL, sendo esta preparada de acordo com o procedimento empregado para amostra.

4.7.2 Quantificação de glicose

A metodologia utilizada para a dosagem de glicose foi o método enzimático descrita por Lloyd e Whelan (1969). Por ação das enzimas glicose oxidase (GOD) e peroxidase (POD), na presença dos reativos, fenol e 4-aminofenazona, a glicose é oxidada, produzindo um composto de coloração rosa. O teor de glicose foi determinado pelo Kit enzimático de GLICOSE PAP (Liquiforme da empresa LABTEST) a partir de 0,01 mL da solução analítica proveniente do Kit. A leitura da absorbância da amostra foi realizada por espectrofotometria a 505 nm. Para quantificação da amostra foi utilizado o mesmo volume da solução do padrão, 0,01 mL, acrescida de 1 mL do reagente analítico originário do Kit. Após esta etapa a mistura foi submetida à vigorosa homogeneização e incubação a 37 °C durante 15 minutos seguidos de leitura em espectrofotômetro.

4.7.3 Quantificação do etanol

A determinação do teor de etanol (EtOH) no meio de fermentação foi realizada no final do processo, por meio do método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - High Performance Liquid Chromatography). Esta quantificação foi realizada com uso do sistema

Shimadzu Prominence UFLC 20A, equipado com coluna Rezex ROA-Shodex® (300 x 7.5 mm) mantida a 60 °C e uso de H₂SO₄ 0,0025 mol L⁻¹ como eluente a 0,6 mL min⁻¹. As amostras foram injetadas de forma automatizada em volumes de 5 µL.

4.7.4 Fator de rendimento de produção ($Y_{p/s}$)

O fator de rendimento em etanol foi calculado pela relação massa de etanol (g) produzida e massa (g) de açúcares totais consumidos. Os resultados foram expressos em $g_{\text{produto}}/g_{\text{substrato}}$, baseado na seguinte equação:

$$\frac{Y_p}{s} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P - P_i}{S_i - S} = \frac{P}{S_i - S}$$

P = concentração de produto final (g/L)

P_i = concentração de produto inicial (g/L)

S = concentração de substrato final (g/L)

S_i = concentração de substrato inicial (g/L)

4.7.5 Eficiência fermentativa (E_f)

Cálculo a partir da relação entre rendimento do produto no processo e o rendimento teórico, dado pela seguinte fórmula:

$$E_f = \frac{Y_{p/s}}{0,511} \times 100$$

E_f = eficiência fermentativa em %

Y_{p/s} = fator de rendimento de produção

0,511 = fator de conversão máximo teórico de glicose em etanol

4.7.6 Rendimento de hidrólise

Considerando o total de celulose na amostra e sua massa inicial, é possível calcular o rendimento das reações de hidrólise. Para isso, tomaram-se os valores máximos obtidos na concentração de glicose (açúcar redutor ao final da sacarificação em g L⁻¹), e o fator de conversão de glicose em celulose (Lu *et al.*, 2013). Os cálculos do rendimento da hidrólise foram realizados pela seguinte equação:

$$\text{Rendimento de hidrólise} = \frac{\text{arsfs}}{\left(\frac{\text{gcel}}{v}\right) \times 0,9} \times 100$$

arsfs = açúcar redutor ao final da sacarificação

gcel = gramas de celulose na biomassa

v = volume utilizado na sacarificação

0,9 = fator de conversão de celulose

4.8 Análise estrutural da biomassa

A microscopia eletrônica de varredura (MEV), e a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram utilizadas para analisar qualitativamente a estrutura lignocelulósica da biomassa *in natura* e após os pré tratamentos, da biomassa comparativamente entre os genótipos avaliados. Também foram realizadas as análises de difratometria de raio x (DRX), para conhecimento da cristalinidade da biomassa, e análise térmica TG.

4.8.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de FOURIER– FTIR

Os espectros de infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR) são frequentemente usados para investigar a estrutura de constituições e mudanças químicas na biomassa lignocelulósica. A obtenção dos espectros de FTIR foram realizadas utilizando um espectrofotômetro Shimadzu IRTracer-100 equipado com um acessório de reflectância difusa. Todos os espectros foram registrados no modo de absorbância no intervalo de números de onda de 550-4000 cm⁻¹ com uma resolução de detecção de 4 cm⁻¹ e 32 varreduras por amostra. Utilizou-se o software Unscrambler 10.3 (Camo) para determinar as posições e intensidades dos picos.

4.8.2 Microscopia eletrônica de varredura - MEV (SEM - scanning electron microscopy)

A morfologia das partículas das amostras, antes e após os pré-tratamentos ácido e o ácido seguido de básico, foi observada por varredura microscopia eletrônica (TESCAN modelo VEGA3 LMH, República Checa) e foi operado a 30 kV com magnificação média de 5000x* (*nas imagens há a magnificação e voltagem referente a cada foto). As amostras estavam presas em uma fita de dupla face sobre um stub (porta amostra) com um diâmetro de

1 cm e uma altura de 1 cm. Este sistema descrito acima foi revestido com ouro utilizando um metalizador (modelo Q150RS QUORUM Quorum Technologies Ltda., Reino Unido).

4.8.3 Difração de Raios-X e cristalinidade - DRX

Para avaliar a cristalinidade das biomassas *in natura* e após os pré-tratamentos, foi realizada a análise de difração de raios-X. A determinação da cristalinidade da celulose foi realizada no Laboratório de Caracterização de Materiais - DEMAT/ CEFET-MG. O equipamento utilizado foi o difratômetro de Raios-X XDR-7000 da SHIMADZU. A configuração adotada para a análise foi o monocromador com fendas (divergência: 0,5; convergência: S1 e 0,3), operado a 40 kV com uma corrente de 20 mA. A velocidade adotada foi de 1°/ min, usando uma radiação de Cu-K α com comprimento de onda de 0,15418 nm (1,541838Å). O índice de cristalinidade (IC) das fibras foi calculado de acordo com a Equação:

$$IC = \frac{I_c - I_{am}}{I_c} \times 100$$

Onde:

I_c = intensidade correspondente ao pico do material cristalino

I_{am} = intensidade da banda referente ao material amorfo

4.8.4 Análises Térmicas: Termogravimetria / Termogravimetria Derivada - (TG / DTG)

A análise térmica foi avaliada por meio das técnicas de análise de TG e DTG. A termogravimetria foi realizada em um equipamento modelo Instruments TGA-Q50, na faixa de temperatura de 20 °C a 800 °C, em atmosfera de nitrogênio, sob fluxo de 100 mL min⁻¹ e taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹. As amostras utilizadas para a análise termogravimétrica foram 4 a 6 mg de biomassa na forma de pó, sendo o diâmetro de partícula menor que 0,15 mm. As perdas de massa associadas com certos intervalos de temperatura são consideradas um indicativo da quantidade de componentes químicos diferentes presentes na biomassa.

4.9 Análises estatísticas

Foi realizada a análise de variância para cada ambiente isoladamente, para verificar a existência de variâncias residuais iguais pela relação entre o maior e o menor quadrado médio do resíduo dos ambientes em todas as características (GOMES e GARCIA, 2002).

Posteriormente, realizaram-se as análises de variância conjunta de acordo com o modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = m + (B/L)/A_{jkm} + G_i + A_j + L_k + GA_{ij} + GL_{ik} + AL_{jk} + GAL_{ijk} + E_{ijk}$$

em que:

Y_{ijk} = observação do genótipo i no ano j e no local k;

m = média geral;

G_i = efeito do i-ésimo genótipo;

A_j = efeito do j-ésimo ano;

L_k = efeito do k-ésimo local

GA_{ij} = efeito da interação i-ésimo genótipo no j-ésimo ano;

GL_{ik} = efeito da interação i-ésimo genótipo no k-ésimo local;

AL_{jk} = efeito da interação j-ésimo ano no k-ésimo local

GAL_{ijk} = efeito do i-ésimo genótipo no j-ésimo ano dentro do k-ésimo local;

E_{ijkm} = erro aleatório experimental médio associado à observação Y_{ijlm} .

Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata, e as análises de variância e o agrupamento das médias pelo teste Schott-Knott adotando-se o nível de 5% de significância ($p < 0,05$), foram feitos pelo *software* estatístico GENES (CRUZ, 2013).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foi obtida a análise de variância individual de cada ambiente e, constatada a homogeneidade das variâncias residuais em todos os caracteres. A razão entre o maior e menor quadrado médio do resíduo obtido nos dois ambientes foi inferior a 7, o que possibilitou a análise conjunta (GOMES e GARCIA, 2002).

O coeficiente de variação, utilizado para verificar a precisão do experimento, apresentou valores considerados baixos a médios (Anexo A), tendo os caracteres FDN e PMS os valores de 3,66 e 17,36, respectivamente. Pimentel-Gomes (1985), analisando os coeficientes de variação obtidos em ensaios agrícolas, classifica-os da seguinte maneira: baixos: $CV < 10\%$; médios: $10\% < CV < 20\%$; altos: $20\% < CV < 30\%$; muito alto: $CV > 30\%$.

Observa-se na análise de variância conjunta efeito significativo ($p \leq 0,05$) para os caracteres altura (ALT), PMV, PMS, FDN, FDA, e lignina para a fonte de variação Híbridos. Esse efeito significativo detectado mostra existência de variabilidade genética entre os genótipos avaliados, que possibilitará a seleção de materiais superiores a fim de obter êxito nos progressos com a seleção (RAMALHO *et al.*, 2012).

Verifica-se também efeito significativo ($p \leq 0,05$) entre ambientes para os caracteres ALT, FDN, FDA, celulose e lignina. A diferença entre os ambientes está relacionada aos aspectos microambientais, especialmente climáticos, como pluviosidade. Na figura 15 pode-se observar o desenvolvimento do sorgo na safra 2015/2016 no ambiente de Couto de Magalhães de Minas.

Verificou-se também que para todos os caracteres avaliados as interações entre Híbrido e Ano, Híbrido e Ambiente, Anos e Ambiente, e Híbrido x Anos x Ambiente não foram significativas, ($p \geq 0,05$), ou seja, os diferentes genótipos apresentaram comportamento coincidente nos locais e safras avaliados, respondendo da mesma maneira às diferentes variações ambientais, indicando a estabilidade. Destaca-se que não houve acamamento em todos os híbridos avaliados.

Figura 15 – Cultivo e desenvolvimento do sorgo biomassa na safra 2015/2016.



DAP= dias após plantio, a= 11 DAP; b= 27 DAP; c= 49 DAP; d, e = 75 DAP; f= 122 DAP. Fonte: *Próprio autor, 2017.*

5.1 Produtividade

Os valores médios das características avaliadas dos cinco genótipos de sorgo biomassa, agrupados pelo teste Scott e Knott a 5% de probabilidade, podem ser observados na tabela 3. Através das médias verifica-se a superioridade do genótipo *bmr* de nervura marrom 201556B002, e dos genótipos convencionais CMSXS7016 e BRS 716 para o caractere PMV, obtendo 81,03 t ha⁻¹, 90,23 t ha⁻¹ e 98,41 t ha⁻¹, respectivamente. Esse resultado corrobora com o estudo realizado por Castro *et al.* (2015), ao avaliar 16 genótipos de sorgo biomassa, no qual obteve médias variando de 124,28 t ha⁻¹ a 69,19 t ha⁻¹. Dados obtidos por Parrella (2013) revelam que o sorgo biomassa possui o potencial de produzir até 102,22 t ha⁻¹ de PMV. O maior acúmulo de biomassa em híbridos de sorgo, de acordo com Olson *et al.*, (2012), pode ser explicado pelo maior período vegetativo (sensibilidade ao fotoperíodo), maior índice de área foliar, maior interceptação e aproveitamento eficiente de radiação (planta C4).

Em relação à produção de massa seca (PMS) os valores médios variaram de 21,14 t ha⁻¹ a 33,28 t ha⁻¹. Os híbridos que se destacaram com maiores produtividades em massa seca foram os CMSXS7016 e BRS 716, com valores de 30,74 t ha⁻¹ e 33,28 t ha⁻¹, respectivamente. Castro *et al.* (2015) obteve resultados semelhantes para os mesmos materiais, encontrando 37 t ha⁻¹ e 36 t ha⁻¹, respectivamente. Esses resultados corroboram com o encontrado por Souza *et*

al. (2016), onde obtiveram médias de 37,95 t ha⁻¹ a 27,95 t ha⁻¹, ao realizar o cultivo nos municípios de Janaúba e Sete Lagoas, respectivamente.

A produção de matéria seca de sorgo biomassa em média pode chegar a mais de 30 t ha⁻¹, sendo que alguns materiais experimentais do programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo já apresentam produtividade acima de 50 t ha⁻¹ de matéria seca (PARRELLA *et al.*, 2011). A característica PMS é uma das mais importantes, pois reflete a produtividade alcançada, e seu efeito significativo permite selecionar o melhor material para alcançar maiores ganhos em biomassa.

5.2 Composição química das biomassas *in natura*

Os valores obtidos para FDN, FDA, celulose, hemicelulose e lignina estão expressos como porcentagem (%) em relação à massa seca a 105 °C (Tabela 3). Os valores médios de FDN e FDA variaram de 66,43% a 71,48%, e 39,45% a 43,98%, respectivamente. Esses resultados corroboram com o encontrado por Castro *et al.*, (2015), onde obteve média de 71% para FDN e valores médios de FDA variando de 38,7% a 51,9%.

Em relação a composição lignocelulósica dos híbridos de sorgo biomassa avaliados, obteve-se valores médios de 34,65% a 36,82% de celulose; 25,26% a 27,86% de hemicelulose e, 4,63% a 7,15% de lignina, respectivamente (Tabela 3). Oliveira *et al.*, (2015), ao avaliar perfil de fibras e minerais de cultivares de sorgo biomassa, encontrou entre 40,0 a 44,4% de celulose, 26,6 a 29,4% de hemicelulose, e 7,7% a 8,9% de lignina.

O efeito significativo para os caracteres hemicelulose e lignina para a fonte de variação híbridos é importante para a tomada de decisão na escolha do material a ser utilizado nos processos de sacarificação e fermentação, com o objetivo de produção de etanol de segunda geração, pois esses caracteres podem influenciar no rendimento final do biocombustível.

A celulose e a hemicelulose são os principais polissacarídeos da biomassa, e seus percentuais impactam no rendimento da hidrólise enzimática e consequentemente na quantidade do etanol obtido. Assim sendo, para a obtenção do etanol de segunda geração, primeiramente há a necessidade da desconstrução da biomassa, com a deslignificação e exposição das fibras celulósicas para que ocorra eficientemente a sacarificação (REIS *et al.*, 2016). Contudo, a lignina que é um composto polifenólico, interfere de maneira negativa no processo de sacarificação (VAN DER WEIJDE *et al.*, 2016), uma vez que dificulta a ação das enzimas ao complexo celulósico, além de ser um meio potencial de liberação de inibidores ao processo fermentativo (KE & CHEN, 2013).

Em relação ao caractere lignina, portanto, os genótipos mutantes *bmr* (201556B002, 201556B003) diferiram significativamente dos genótipos convencionais, apresentando menores percentuais. Os baixos teores de lignina nos híbridos 201556B002 e 201556B003, (Tabela 3), sugerem que a presença do alelo *bmr* nesses materiais, confere à biomassa diferenças significativas na composição da parede celular vegetal, além de promover uma melhor digestibilidade da fibra. Resultado semelhante foi relatado por Simeone *et al.* (2018).

Ao comparar a biomassa do sorgo ao bagaço de cana-de-açúcar, resíduo lignocelulósico mais amplamente estudado para a produção de etanol de segunda geração, observa-se uma grande vantagem, pois em média a composição do bagaço de cana-de-açúcar é de 35-45% de celulose, 26,2-35,8% de hemicelulose e 11,4-25,2% de lignina (ZHAO *et al.*, 2009; CANILHA *et al.*, 2011; SAINI *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2017). Reis *et al.*, (2016) também obteve menores teores de lignina em bagaço de sorgo frente ao de cana-de-açúcar. Portanto, altos teores de lignina nos materiais lignocelulósicos aumentam o custo de todo o processo, pois além da lignina adsorver de forma irreversível enzimas e inibir sua ação nas cadeias de celulose, são necessários pré-tratamentos mais severos com a finalidade de diminuir a recalcitrância da biomassa vegetal (KAPOOR *et al.*, 2017; RASTOGI e SHRIVASTAVA, 2017). A viabilidade econômica da produção de bioetanol em escala industrial tem como fator determinante a eficiência do pré-tratamento e da hidrólise da biomassa lignocelulósica (PATEL *et al.*, 2017).

O teor de hemicelulose não apresentou diferença significativa entre os ambientes, e pelo teste de média não foi possível observar a diferença entre os materiais. Sob a perspectiva de utilização de hemicelulose, os valores significativos podem representar um importante fator no aumento da produção de etanol a partir da cofermentação de pentoses (C5) e hexoses (C6) (RASTOGI & SHRIVASTAVA, 2017).

1 **Tabela 3 - Valores médios de caracteres agronômicos e composição lignocelulósica do sorgo biomassa cultivado em Sete Lagoas e Couto**
 2 **de Magalhães de Minas, nas safras 2015/2016 e 2016/2017.**

Híbridos	PMV	PMS	ALT	FDA	FDN	Celulose	Hemicelulose	Lignina
201556(B)002	81,03 a	22,46 b	3,88 a	39,62 a	66,43 a	34,98 a	26,80 a	4,63 b
201556(B)003	74,83 b	21,14 b	3,88 a	39,45 a	67,32 a	34,65 a	27,86 a	4,80 b
CMSXS7027	76,72 b	25,46 b	4,43 a	43,98 a	71,48 a	36,82 a	27,50 a	7,15 a
CMSXS7016	90,23 a	30,74 a	4,25 a	41,66 a	67,99 a	35,19 a	26,32 a	6,47 a
BRS716	98,41 a	33,28 a	4,31 a	41,87 a	67,13 a	35,05 a	25,26 a	6,81 a
Sete Lagoas 1	84,69 a	29,46 a	4,57 a	45,56 a	72,65 a	38,46 a	27,08 a	7,10 a
Couto 1	76,50 a	23,66 a	3,78 b	41,23 b	68,25 b	35,76 a	27,01 a	5,46 b
Sete Lagoas 2	83,61 a	24,89 a	4,48 a	41,21 a	68,43 a	34,64 a	27,21 a	6,57 a
Couto 2	86,75 a	26,08 a	3,64 b	37,47 a	63,91 b	32,95 a	26,43 a	4,51 b

3 Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste “Scott Knott”, em nível de 5% de probabilidade. ALT= altura de plantas (m); PMV=
 4 produção de massa verde (t ha⁻¹); PMS= produção massa seca (t ha⁻¹); FDA= fibra detergente ácido; FDN= fibra detergente neutro; Sete Lagoas 1= Safra 2015/2016 em Sete
 5 Lagoas; Couto 1 = Safra 2015/2016 em Couto de Magalhães de Minas; Sete Lagoas 2= Safra 2016/2017 em Sete Lagoas; Couto 2 = Safra 2016/2017 em Couto de Magalhães
 6 de Minas.

Como os híbridos convencionais apresentaram maiores teores de lignina e, os percentuais de celulose não diferiram estatisticamente entre os materiais, assume-se, portanto, que os híbridos de nervura marrom *bmr* de sorgo biomassa são matérias primas mais promissoras para a obtenção do etanol de segunda geração. Estes genótipos agregam alta produção de biomassa com baixos teores de lignina, características ideais para a produção de etanol 2G.

5.3 Concentração de açúcares e inibidores no hidrolisado ácido

O objetivo principal do pré-tratamento ácido foi solubilizar a fração hemicelulósica da biomassa e tornar a celulose mais acessível à sacarificação enzimática para a liberação seletiva de hexoses no passo subsequente. Contudo apesar da fermentação de açúcares de cinco carbonos não ser o foco desse trabalho, o hidrolisado ácido obtido após o pré-tratamento com H_2SO_4 da biomassa *in natura* do sorgo, foi analisado por HPLC para quantificação do teor de açúcares e possíveis inibidores presentes, pois a fração desse hidrolisado hemicelulósico tem o potencial para ser utilizado na obtenção de etanol a partir de pentoses. Portanto, o conhecimento dos teores de inibidores é fundamental para a tomada de decisão em relação ao uso de determinado pré-tratamento. O pré-tratamento da biomassa com ácido diluído também proporciona a recuperação de um hidrolisado rico em pentoses, principalmente D-xilose (GOTO e KAMIYA, 2016; TIZAZU & MOHOLKAR, 2017), além de conter glicose e arabinose (Tabela 5). Também há a produção de furfural, que é o produto de degradação das pentoses, enquanto a glicose pode ser degradada em 5- hidroximetilfurfural (HMF). Estes compostos atuam como inibidores e modulam a atividade das enzimas durante o processo de fermentação (CHANDRA *et al.*, 2007).

Os valores médios em gramas por litro ($g\ L^{-1}$) de HMF, furfural, ácido acético e glicerol podem ser observados na Tabela 4. Considerando que os furanos são os compostos que mais afetam negativamente os microrganismos no processo da fermentação (VAN DER POL, 2014), observa-se, portanto, que os teores variaram de $0,0021(2,1 \times 10^{-3})\ g/L$ a $3,0 \times 10^{-3}\ g/L$ de HMF, e de $3,6 \times 10^{-4}$ a $4,3 \times 10^{-4}\ g/L$ de Furfural.

Tabela 4 - Teores médios de HMF g L⁻¹, Furfural g L⁻¹, ác. acético g L⁻¹ e glicerol g L⁻¹ do hidrolisado ácido do sorgo biomassa cultivado em Sete Lagoas e Couto de Magalhães de Minas na safra 2015/2016.

Híbridos	HMF (g L ⁻¹)	Furfural (g L ⁻¹)	Ác.Acético(g L ⁻¹)	Glicerol (g L ⁻¹)
201556(B)002	0,0030 a	0,00043 a	5,20 a	1,08 b
201556(B)003	0,0021 a	0,00039 a	5,37 a	1,27 b
CMSXS7027	0,0028 a	0,00036 a	5,58 a	1,00 b
CMSXS7016	0,0022 a	0,00041 a	5,44 a	1,04 b
BRS716	0,0027 a	0,00042 a	5,38 a	1,61 a
Sete Lagoas	0,0020 b	0,00039 b	5,55 a	1,04 b
Couto	0,0029 a	0,00045 a	5,30 a	1,39 a

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste “Scott Knott”, em nível de 5% de probabilidade para cada local.

Verificou-se que o tratamento com ácido diluído proporcionou altos rendimentos de açúcares redutores (Tabela 5), tendo o híbrido de nervura marrom *bmr* 201556B002 alcançado um total de 65,79 g L⁻¹. Patel *et al.*, (2017), estudando o hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar, obtiveram 41,19 g L⁻¹ de açúcares redutores. Contudo Aguilar *et al.*, (2002), também utilizando o bagaço de cana-de-açúcar, obtiveram valores bem inferiores aos encontrados para o sorgo biomassa, sendo 24 g L⁻¹.

Tabela 5 - Valores médios de glicose, xilose e arabinose (g L⁻¹) do hidrolisado ácido do sorgo biomassa cultivado em Sete Lagoas e Couto de Magalhães de Minas na safra 2015/2016.

Híbridos	Glicose (g L ⁻¹)	Xilose (g L ⁻¹)	Arabinose (g L ⁻¹)
201556(B)002	20,64 a	39,86 a	5,29 a
201556(B)003	16,72 b	39,48 a	5,69 a
CMSXS7027	19,82 a	38,25 a	4,34 a
CMSXS7016	17,99 b	38,74 a	4,88 a
BRS716	19,80 a	38,58 a	4,62 a
Sete Lagoas	14,84 b	38,54 a	4,95 a
Couto	22,09 a	39,83 a	5,18 a

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste “Scott Knott”, em nível de 5% de probabilidade para cada local

5.4 Composição lignocelulósica das biomassas após pré-tratamentos

Os resultados da caracterização lignocelulósica da biomassa de sorgo, após os pré-tratamentos químicos por ácido diluído e após tratamento alcalino, estão apresentados nas Tabela 6. A produção de celulose eficiente e econômica é conseguida extraindo a quantidade máxima de fibras de celulose das culturas através da deslignificação. Portanto, os pré-tratamentos são fundamentais para a remoção da hemicelulose e da lignina, diminuição da cristalinidade da celulose e aumento da área superficial dos materiais, facilitando assim a subsequente hidrólise enzimática.

Os valores médios de celulose, hemicelulose e lignina variaram de 63,55% a 69,97%, 2,68% a 4,12 %, e 24,20% a 16,72%, respectivamente, após o tratamento com H₂SO₄ das biomassas *in natura* (Tabela 6).

Tabela 6 - Valores médios de celulose, hemicelulose, lignina (%) do sorgo biomassa *in natura*, após tratamento ácido, e após tratamento ácido seguido por alcalino, cultivado em Sete Lagoas e Couto de Magalhães de Minas nas safras 2015/2016 e 2016/2017.

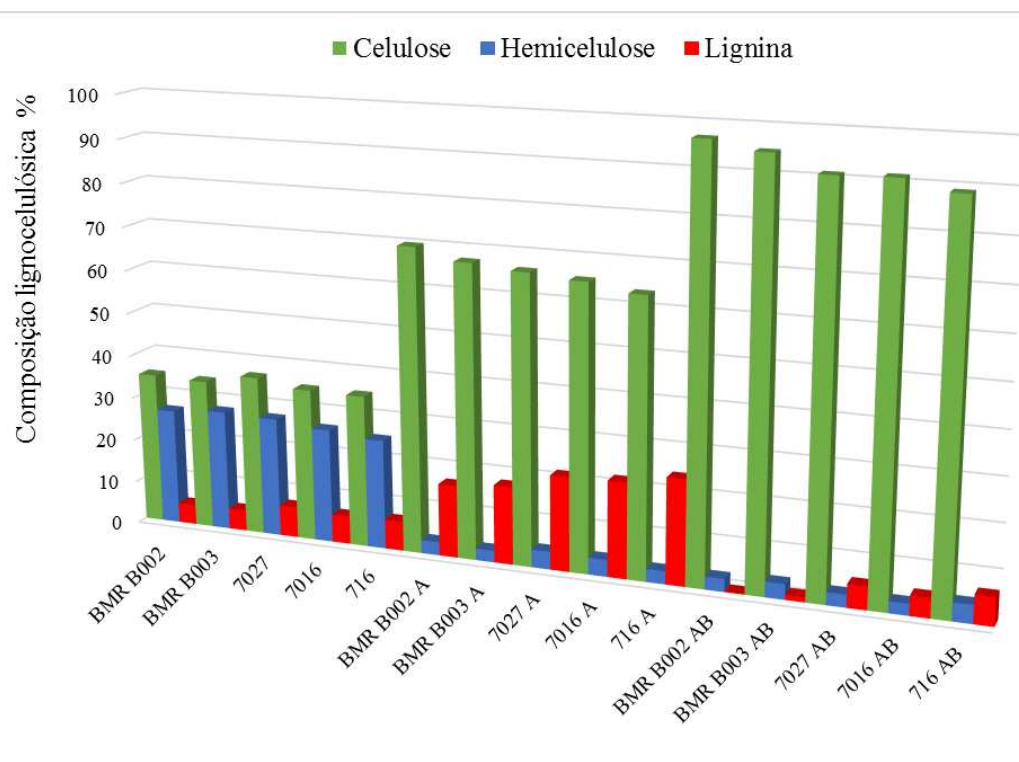
Biomassa <i>in natura</i>				Após trat. ác			Após trat. ác + bs		
Híbridos	Celulose	Hemicel	Lignina	Celulose	Hemicel	Lignina	Celulose	Hemicel	Lignina
201556(B)002	34,98 a	26,80 a	4,63 b	69,97 a	3,06 a	16,72 c	97,02 a	2,97 a	0,2 b
201556(B)003	34,65 a	27,86 a	4,80 b	67,41 b	2,68 a	17,97 c	94,99 a	3,52 a	1,15 b
CMSXS7027	36,82 a	27,50 a	7,15 a	66,35 c	4,12 a	21,71 b	91,14 b	2,91 a	5,33 a
CMSXS7016	35,19 a	26,32 a	6,47 a	65,37 c	3,90 a	22,02 b	91,45 b	2,68 a	4,55 a
BRS716	35,05 a	25,26 a	6,81 a	63,55 c	3,00 a	24,20 a	89,13 b	4,23 a	6,46 a
Sete Lagoas	38,46 a	27,08 a	7,10 a	65,41 b	3,61 a	19,92 a	93,71 a	3,66 a	2,82 a
Couto de Magalhães de Minas	35,76 a	27,01 a	5,46 b	67,91 a	2,72 b	19,99 a	93,06 a	2,82 a	3,07 a

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste “Scott Knott”, em nível de 5% de probabilidade para cada local. Hemicel = Hemicelulose; trat. ác = tratamento ácido; trat. ác+bs = tratamento ácido seguido de alcalino.

Os valores médios de celulose, hemicelulose e lignina variaram de 89,13% a 97,02%, 2,68% a 4,23 %, e 0,2% a 6,46%, respectivamente, após o tratamento com NaOH das biomassas pré-tratadas com ácido. Verificou-se que o percentual de celulose aumentou continuamente após cada pré-tratamento com ácido ou base, obtendo diferença significativa, comparado a biomassa *in natura*. A quantidade de celulose variou desde um teor inicial de 35%

até cerca de 90% aproximadamente (Figura 16), sob pré-tratamento utilizando NaOH a 7%. Observou-se também que o pré-tratamento foi eficiente na remoção da lignina, principalmente para os híbridos *bmr*.

Figura 16 - Composição (%) lignocelulósica das biomassas de sorgo.



(A) biomassa após tratamento com H_2SO_4 , (AB) biomassa após tratamento com $H_2SO_4 + NaOH$.

(B) Fonte: *Próprio autor*, 2018.

Na grande maioria dos processos de pré tratamento não ocorre a remoção total ou eficiente da lignina (TALEBNIA *et al.*, 2010), e por isso em alguns casos é necessário outro processo de deslignificação. Portanto, verificou-se que os híbridos de nervura marrom *bmr* apresentaram diferença significativa na remoção da lignina, resultando em valores próximos de zero (Tabela 6).

Após o tratamento com NaOH, a cor das fibras foi alterada de marrom escuro para amarelo, sugerindo a quantidade reduzida de lignina (Figura 17). Na Figura 18, observa-se a biomassa *in natura* (a), após o pré-tratamento com ácido (b), e após o pré-tratamento ácido seguido de alcalino (c).

Figura 17 - Biomassa de sorgo após o tratamento com NaOH.



(a) cadinho com a biomassa de sorgo deslignificada, após neutralização e filtração a vácuo, (b) cadinho com a biomassa deslignificada antes da neutralização e filtração. Fonte: *Próprio autor, 2018*.

Figura 18 - Biomassa de sorgo *in natura* e após os tratamentos.

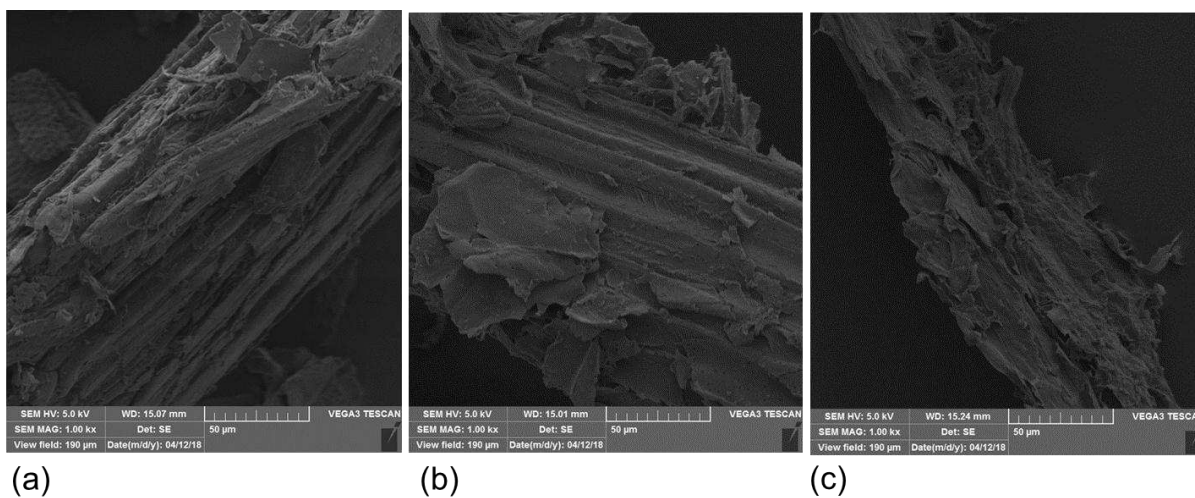


(a) biomassa *in natura*, (b) biomassa após tratamento com H_2SO_4 , (c) biomassa após tratamento com H_2SO_4 + NaOH. Fonte: *Próprio autor, 2018*.

5.5 Análise MEV

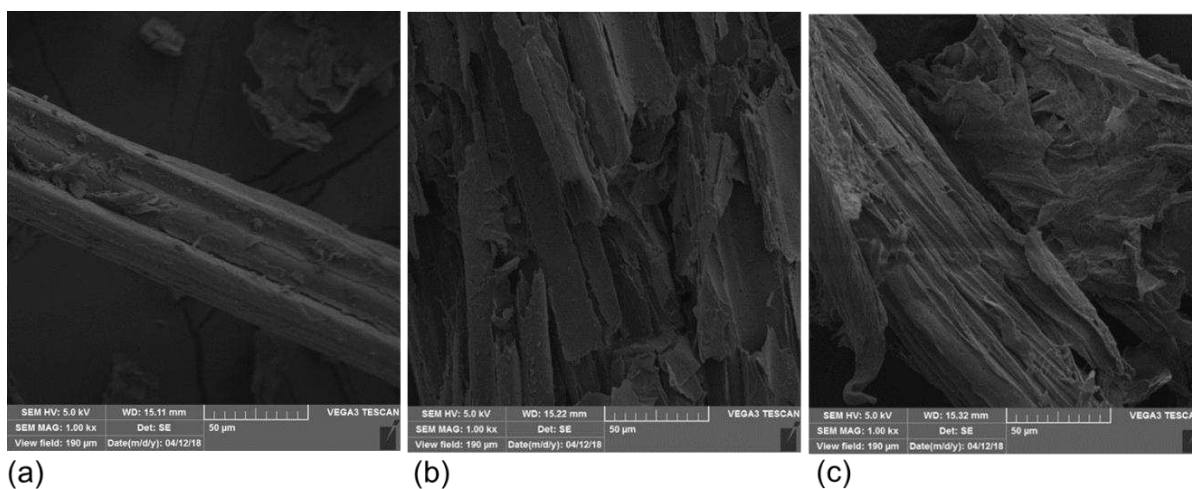
A Microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada para avaliar as modificações estruturais morfológicas da biomassa do sorgo. Imagens da MEV com ampliação de 1000× explicaram as mudanças ocorridas durante os pré-tratamentos (Figuras 19 e 20). No caso da biomassa *in natura*, não tratada (Figuras 19a e 20a), a estrutura observada era rígida, altamente conservada, compacta e não porosa. Verificou-se que as amostras pré-tratadas estavam fragmentadas, o que pode ser devido à quebra da rede de celulose-hemiceluloses-lignina, levando à remoção das frações hemicelulósica (Figuras 19b e 20b) e lignina (Figuras 19b e 20c).

Figura 19 - MEV 1000x híbrido *bmr*.



(a) biomassa *in natura*, (b) biomassa após tratamento com H_2SO_4 , (c) biomassa após tratamento com $H_2SO_4 + NaOH$. Fonte: *Próprio autor, 2018*.

Figura 20 - MEV 1000x híbrido convencional.



(a) biomassa *in natura*, (b) biomassa após tratamento com H_2SO_4 , (c) biomassa após tratamento com $H_2SO_4 + NaOH$. Fonte: *Próprio autor, 2018*.

Durante o pré-tratamento ácido, ligações de hidrogênio intermoleculares da celulose podem ficar parcialmente interrompidas e, assim, resultar na estrutura porosa com alta área superficial (LINDMAN *et al.*, 2017). Isto é benéfico para as enzimas penetrarem, adsorverem e facilmente hidrolisarem a biomassa durante a hidrólise. Observações idênticas foram relatadas anteriormente para topos de cana-de-açúcar pré-tratados com ácido (SINDHU *et al.*, 2011).

5.6 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

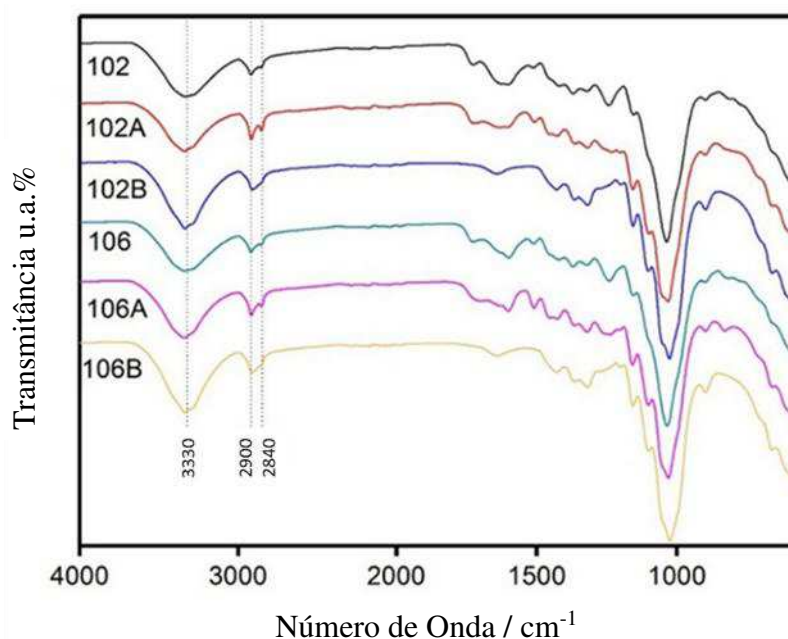
Os espectros de infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR), utilizados para investigar a presença de grupos funcionais e as mudanças químicas na biomassa lignocelulósica, apresentam vantagens sobre os métodos químicos convencionais que consomem tempo, reagentes e podem resultar na degradação dos polímeros naturais (XU *et al.*, 2013). Os espectros de FTIR para o sorgo *in natura* e pré-tratados foram diferentes, explicando as mudanças estruturais na biomassa que ocorreram durante os pré-tratamentos.

A Figura 21 mostra os espectros de FTIR de amostras não tratadas, tratadas com ácido (A) e tratadas com ácido seguido de base (B), no genótipo mutante *bmr* 201556(B)002 e no convencional BRS 716, na região do comprimento de onda de 4.000 a 800 cm^{-1} .

Os espectros de FTIR do sorgo biomassa mostram várias bandas de absorção que podem ser atribuídas aos principais componentes estruturais: celulose, hemicelulose e lignina. A região de 4.000 a 1800 cm^{-1} dos espectros de transmitância apresenta poucas bandas, que são atribuídas ao grupo O-H (em torno de 3.340 cm^{-1}) e ao grupo C-H (2.927 cm^{-1}). A região entre 1.800 a 900 cm^{-1} apresenta bandas mais complexas, em função de vários modos de vibração dos carboidratos e lignina (GILBERT *et al.*, 1993; PANDEY, 1999).

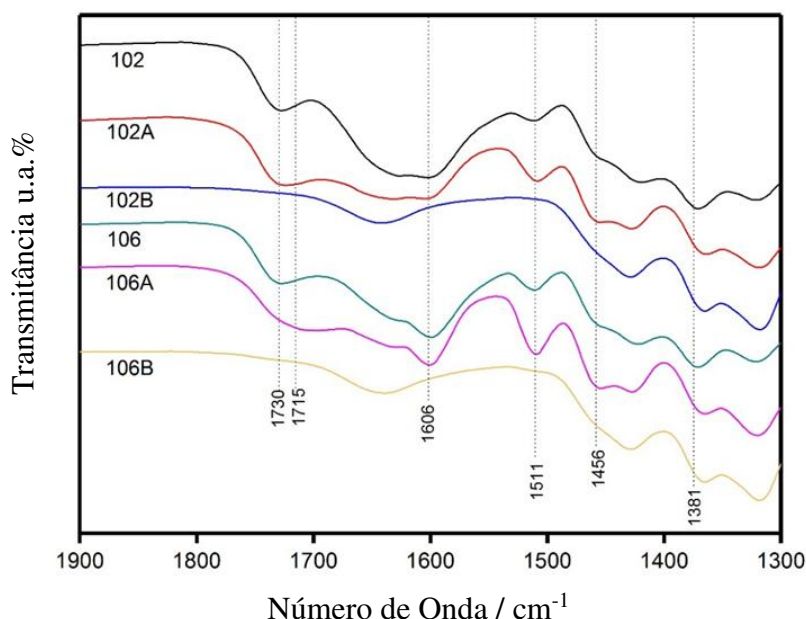
Embora todos os espectros do sorgo biomassa apresentem características semelhantes, pequenas mudanças foram observadas entre os espectros. Por exemplo, não houve picos em 1.714 – 1.642 cm^{-1} para a biomassa não tratada. A banda de hemicelulose apareceu a 1.730 cm^{-1} (Figura 19) para todas as amostras sem tratamento, assim como observado por GUO *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2009; PANDEY, 1999; SUN e TOMKINSON, 2005). De acordo Liu *et al.*, (2005), nas paredes celulares este pico tem sido relacionado com ésteres alquílicos saturados a partir da hemicelulose.

Figura 21 - Espectros de FTIR do sorgo biomassa *in natura* e pré-tratados, na região do comprimento de onda de 4.000 a 800 cm^{-1} . 102 = Híbrido *bmr*; 106 = Híbrido convencional.



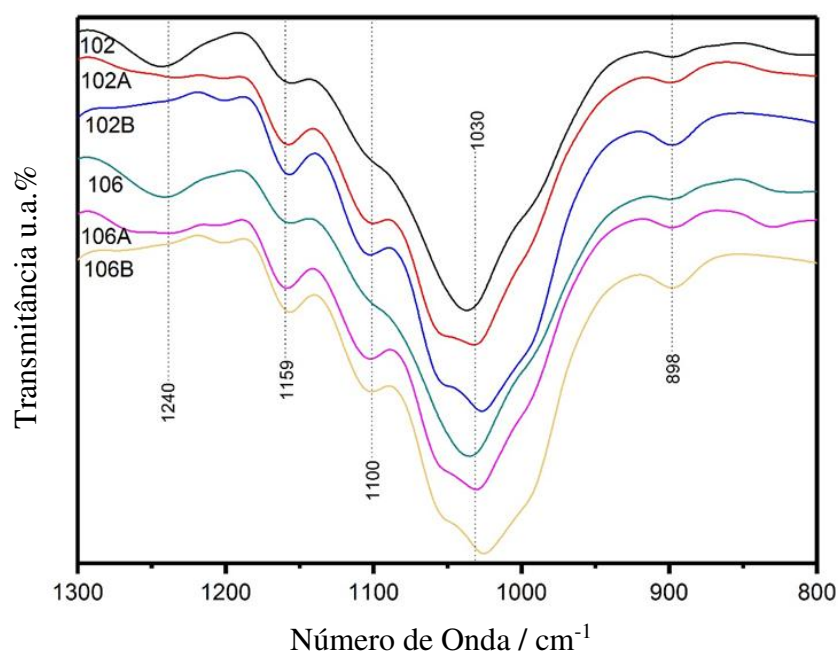
102 = Híbrido *bmr* 201556B002 *in natura*; **102A** = Híbrido *bmr* 201556B002 tratado com ácido; **102B** = Híbrido *bmr* 201556B002 tratado com ácido seguido por base; **106** = Híbrido convencional BRS716 *in natura*; **106A** = Híbrido convencional BRS716 tratado com ácido; **106B** = Híbrido convencional BRS716 tratado com ácido seguido por base. Fonte: *Próprio autor*, 2018.

Figura 22 - Espectros de FTIR do sorgo biomassa *in natura* e pré-tratados, na região do comprimento de onda de 1.900 a 1.300 cm^{-1} . 102 = Híbrido *bmr*; 106 = Híbrido convencional.



102 = Híbrido *bmr* 201556B002 *in natura*; **102A** = Híbrido *bmr* 201556B002 tratado com ácido; **102B** = Híbrido *bmr* 201556B002 tratado com ácido seguido por base; **106** = Híbrido convencional BRS716 *in natura*; **106A** = Híbrido convencional BRS716 tratado com ácido; **106B** = Híbrido convencional BRS716 tratado com ácido seguido por base. Fonte: *Próprio autor*, 2018.

Figura 23 -. Espectros de FTIR do sorgo biomassa *in natura* e pré-tratados, na região do comprimento de onda de 1.300 a 800 cm^{-1} . 102 = Híbrido *bmr*; 106 = Híbrido convencional.



102 = Híbrido *bmr* 201556B002 *in natura*; **102A** = Híbrido *bmr* 201556B002 tratado com ácido; **102B** = Híbrido *bmr* 201556B002 tratado com ácido seguido por base; **106** = Híbrido convencional BRS716 *in natura*; **106A** = Híbrido convencional BRS716 tratado com ácido; **106B** = Híbrido convencional BRS716 tratado com ácido seguido por base. Fonte: *Próprio autor*, 2018.

Observou-se também que nenhuma banda acentuada de hemicelulose foi detectada após os pré-tratamentos (Figura 22), indicando que a hemicelulose foi grandemente hidrolisada. No material *bmr*, 102A, a banda de hemicelulose 1730 aparece suavemente quando comparada ao material sem tratamento. A análise da composição lignocelulósica do sorgo biomassa (Tabela 6) corrobora com as observações do FTIR, de que o teor de hemicelulose da biomassa diminui significativamente após os pré-tratamentos.

Bandas relacionadas à lignina nos espectros de FTIR podem ser observadas em torno de 1.268, 1.329, 1.610 e 1.715 cm^{-1} (KUMAR *et al.*, 2009; PANDEY, 1999). A banda em 1.511 cm^{-1} , atribuída à ligação C = C de lignina foi observada para todas as biomassas não tratadas (Figura 22), e foi de grande intensidade para as biomassas após o tratamento ácido. Esta banda não foi observada após o pré-tratamento básico, indicando a remoção eficiente desse polímero, assim como pode ser observado na Tabela 6.

Deteção de uma banda de absorção em 1.715 cm^{-1} (Figura 22), devido ao estiramento de C = O das cadeias laterais do grupo fenil éster da estrutura da lignina, em resíduos sólidos pré-tratados mostraram que algumas hemiceluloses não foram clivadas após o pré-tratamento com ácido diluído. Este resultado confirma o resultado anterior para análise de

composição química de amostras de biomassa, no qual o pré-tratamento ácido diluído pode remover a maior parte da hemicelulose da biomassa, enquanto a maior parte da celulose e lignina permanece nos resíduos sólidos.

A banda de $1.606-1610\text{ cm}^{-1}$ está associada à dupla ligação presente na cadeia lateral em estruturas semelhantes à lignina (CORREDOR *et al.*, 2009; KUMAR *et al.*, 2009; PANDEY, 1999). Para todas as amostras, esta banda foi bem definida após o pré-tratamento ácido (Figura 22).

O sorgo biomassa possui dois tipos principais de lignina: anéis de guaiacil e siringil. A banda a $1508-1511\text{ cm}^{-1}$ está associada ao anel guaiacil na lignina (CORREDOR *et al.*, 2009; PANDEY, 1999). Esta banda foi observada (Figura 22) em todas as amostras de biomassa não tratada, e após o pré-tratamento básico não foi observada.

A faixa em torno de 1456 cm^{-1} deve-se à absorção de anéis de siringil na lignina (CORREDOR *et al.*, 2009; PANDEY, 1999, GASTALDI *et al.*, 1998). Esta banda foi observada em todas as amostras não tratadas (Figura 22) e após o tratamento ácido.

Bandas relacionadas à celulose nos espectros de FTIR foram observadas em torno de $898, 1320\text{ cm}^{-1}$ (Figura 23), $1423, 2920$ e, 3340 cm^{-1} (Figura 22), assim como observado por GASTALDI *et al.*, 1998; KUMAR *et al.*, 2009; PANDEY, 1999; GILBERT *et al.*, 1993, sendo mais acentuadas para o material *bmr* após o tratamento básico, evidenciando a maior proporção de celulose nesse material.

Tabela 7 - Atribuição das principais bandas observadas nos espectros de FTIR para sorgo biomassa.

<i>Número de onda (cm^{-1})</i>	<i>Amostras</i>	<i>Atribuição</i>	<i>Referência</i>
3300	Todas	Estiramento O-H	Pandey (1999).
2900	Todas	Estiramento assimétrico dos grupos C-H	Pandey (1999).
2840		Estiramento simétrico dos grupos C-H	Pandey (1999).
1730	Amostras não tratadas	C=O dos ésteres de alquila da hemicelulose	Pandey (1999). Corredor <i>et al.</i> , (2009); Liu <i>et al.</i> , (2005).

1715	Bem definido após o tratamento ácido	C=O dos ésteres de fenila da lignina	Corredor (2009);
1606	Bem definido após o tratamento ácido	Vibração dos anéis aromáticos da lignina	Pandey (1999)
1511	Bem definido após o tratamento ácido	Estiramento C-O do anel guaiacyl da lignina	Corredor <i>et al.</i> , (2009).
1456	Bem definido após o tratamento ácido	Deformação C-H anéis siringyl da lignina	Corredor <i>et al.</i> , (2009).
1381	Todas	Deformação simétrica de grupos C-H da celulose	Gastaldi <i>et al.</i> , (1998); Gilbert <i>et al.</i> (1993).
1240	Amostras não tratadas	Deformação C-O-H e estiramento C-O de grupos fenólicos	
1159	Todas	Estiramento antissimétrico C-O-C da ligação glicosídica da celulose	Gilbert <i>et al.</i> , (1993); Corredor <i>et al.</i> , (2009).
1100	Definido após os tratamentos	Estiramento C-O dos álcoois secundários da glicose	Pandey (1999); Corredor <i>et al.</i> , (2009).
1030	Todas	Vibrações C-O da celulose	Corredor <i>et al.</i> , (2009).
898	Todas	Estiramento do anel de glicose	Kumar <i>et al.</i> , (2009); Corredor <i>et al.</i> , (2009).

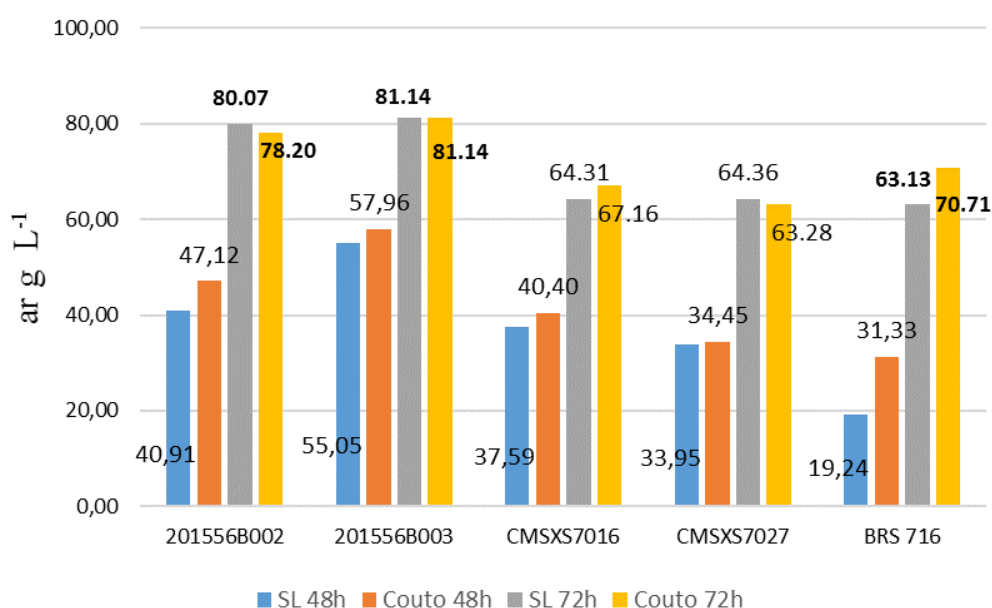
5.7 Rendimentos de etanol por genótipo (Sacarificação e Fermentação)

Os resultados (Tabela 8) demonstraram que o tratamento ácido seguido por base apresentou o melhor rendimento após a hidrólise enzimática do que utilizando apenas ácido como pré-tratamento, corroborado pelas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura

(MEV) e Análise de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) que demonstraram a modificação estrutural desejável.

Observa-se que os híbridos *bmr* 201556B002 e 201556B003 resultaram em maiores rendimentos de hidrólise nos dois testes de sacarificação. A eficiência de amostras pré-tratadas para produzir açúcares fermentáveis, (Figura 24), foi avaliada medindo a quantidade total de açúcar redutor liberada das amostras após 48 horas e 72 horas de hidrólise enzimática. Esse resultado reafirmou a vantagem do híbrido *bmr*. Destaca-se também que, quando avaliado o fator de rendimento de produção (Yp/s) e a eficiência fermentativa (Tabela 8), o híbrido *bmr* mais uma vez demonstra vantagem sobre os convencionais, pois observa-se que são necessárias menores quantidades de biomassa desse híbrido para obter a mesma quantidade de etanol.

Figura 24 - Quantidade em gramas por litro de açúcar redutor liberado, após sacarificação e fermentação separado.



Esse resultado corrobora que as mudanças na estrutura e na composição química do sorgo mutante são mais favorecidas do que em relação aos híbridos convencionais, os quais naturalmente apresentam maiores teores de lignina. Verificou-se que na cidade de Sete Lagoas o híbrido mutante 201556B002 e o híbrido convencional BRS 716 apresentaram valores de etanol por hectare significativamente superior aos demais, obtendo valores de 11567,86 L ha⁻¹ e 10587,97 L ha⁻¹, respectivamente. Na cidade de Couto de Magalhães de Minas o híbrido BRS 716 apresentou a melhor produtividade de etanol, alcançando 11838,46 L ha⁻¹.

Tabela 8 - Valores médios de rendimento de produção (Yp/s), hidrólise e eficiência fermentativa (Ef).

Híbridos	Ȳp/s (g/g)		Rendimento de hidrólise		Rendimento de hidrólise		Ef (%)	
			SFS ác. (%)		SFS ác.+bs (%)			
	Sete Lagoas	Couto M. Minas	Sete Lagoas	Couto M. Minas	Sete Lagoas	Couto M. Minas	Sete Lagoas	Couto M. Minas
201556(B)002	0,42 Aa	0,33 Ba	33,16 Ba	39,52 Aa	74,66 Aa	72,15 Aa	87,98 Aa	71,47 Ba
201556(B)003	0,26 Ab	0,31 Aa	25,41 Bb	39,86 Aa	77,51 Aa	76,43 Aa	53,00 Ac	64,36 Aa
CMSXS7027	0,23 Bc	0,29 Aa	15,77 Bc	24,89 Ab	62,68 Ab	67,19 Aa	55,76 Ac	67,11 Aa
CMSXS7016	0,20 Bc	0,26 Aa	18,23 Bc	26,89 Ab	62,60 Ab	63,11 Aa	49,70 Ac	65,27 Aa
BRS716	0,28 Ab	0,31 Aa	13,12 Bc	20,52 Ac	63,39 Ab	71,78 Aa	69,29 Ab	68,32 Aa

L ha⁻¹ = litros por hectare; SFS = sacarificação e fermentação separado; SSF = sacarificação e fermentação simultânea; Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste “Scott Knott”, em nível de 5% de probabilidade para cada local.

Os valores de etanol para os híbridos de sorgo biomassa aqui avaliados (Tabela 9) foram superiores aos já registrados para a cana-de-açúcar, a principal matéria prima sacarina utilizada para a produção do etanol de primeira geração, com valores de produtividade de 4.508 L ha⁻¹ a 7.167 L ha⁻¹ (MENDES *et al.*, 2017). Essa vantagem potencial do sorgo se mantém mesmo se considerada a quantidade de etanol que se pode obter do bagaço da cana-de-açúcar, através da tecnologia de 2ª geração, aproximadamente 3.000 L ha⁻¹ (BENJAMIN *et al.*, 2014). A produção de etanol obtida nesse estudo também se posiciona em vantagem quando comparado ao milho, principal matéria prima utilizada nos Estados Unidos da América. Duvernay *et al.* (2013), relataram produtividade entre 2.800 e 3.800 L ha⁻¹ de etanol de milho, ou seja, valores inferiores ao híbrido de sorgo biomassa com a menor produtividade nesse estudo (201556B003 = 6.612,57 L ha⁻¹).

As produtividades de etanol a partir do sorgo biomassa, com resultados elevados e satisfatórios, reafirmam a potencialidade dessa cultura para o fornecimento de biocombustíveis, além de possibilitar a oferta de matéria prima em um período máximo de seis meses, sendo, portanto, muito mais eficiente que a cana-de-açúcar a qual apresenta um ciclo de doze a dezoito meses.

Tabela 9 - Valores médios etanol L ha⁻¹ da biomassa de sorgo após tratamento ácido e ácido seguido por alcalino.

Híbridos	L EtOH/ ha SFS ác.		L EtOH/ ha SFS ác.+bs		L EtOH/ ha SSF	
	Sete Lagoas	Couto M. Minas	Sete Lagoas	Couto M. Minas	Sete Lagoas	Couto M. Minas
201556(B)002	3821,21 Aa	4220,28 Aa	11567,86 Aa	9232,21 Bb	9288,38 Aa	8286,97 Bb
201556(B)003	3715,52 Aa	4196,27 Aa	6612,57 Ab	8080,50 Ab	7767,84 Ab	8511,44 Ab
CMSXS7027	2806,64 Bb	3577,77 Ab	6671,33 Bb	8459,30 Ab	7423,88 Ab	7369,04 Ac
CMSXS7016	3788,22 Ba	4520,18 Aa	7256,25 Bb	9316,34 Ab	9323,90 Ba	10330,07 Aa
BRS716	3976,62 Aa	4401,47 Aa	10587,97 Aa	11838,46 Aa	8166,88 Bb	10820,36 Aa

SFS = sacarificação e fermentação separado; SSF = sacarificação e fermentação simultânea; Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste “Scott Knott”, em nível de 5% de probabilidade para cada.

5.8 Difração de Raios X

Os diferentes tratamentos aplicados nas biomassas do sorgo, proporcionaram uma variação no índice de cristalinidade (IC), Tabela 10, em relação à celulose comercial, que apresentou um IC de 79,9 %. As intensidades dos picos cristalinos e do halo amorfo foram obtidas através dos gráficos das Figuras 25, 26 e 27. O índice de cristalinidade corresponde à proporção entre a região cristalina (I₂₀₀) e amorfa (I_{am}) (LENGOWSKI *et al.*, 2013).

Observa-se na Tabela 10 um aumento do IC nas amostras tratadas, corroborando com o encontrado por MIRANDA *et al.*, (2015), o qual detectou IC crescente proporcional a concentração da solução alcalina utilizada para tratar fibras de piaçava. O aumento do índice de cristalinidade também foi observado por PHITSUWAN, SAKKA e RATANAKHANOKCHAI (2016) ao aplicar, dentre outras bases, hidróxido de sódio no pré-tratamento alcalino do capim-elefante (*Pennisetum purpureum*), em que houve um aumento de 46,0% do material *in natura* para 49,8% (pré-tratado com NaOH 2%).

Tabela 10 - Índice de cristalinidade das biomassas do sorgo após diferentes tratamentos.

<i>Amostra</i>	<i>I₂₀₀</i>	<i>I_{am}</i>	<i>IC</i>
<i>Celulose</i>	2670	536	79,9
<i>201556B002</i>	1510	496	67,2
<i>201556B002A</i>	1510	496	67,2
<i>201556B002B</i>	3460	744	78,5
<i>201556B003</i>	1016	542	46,7

201556B003A	1420	502	64,6
201556B003B	2648	622	76,5
CMSXS7027	1108	558	49,6
CMSXS7027A	1720	610	64,5
CMSXS7027B	2886	726	74,8
CMSXS7016	1154	592	48,7
CMSXS7016A	1666	590	64,6
CMSXS7016B	3272	762	76,7
BRS 716	1058	594	43,9
BRS 716A	1762	622	64,7
BRS 716B	3154	726	77,0

Os tratamentos com H_2SO_4 e com NaOH utilizados nas biomassas de sorgo, demonstraram eficiência na remoção da fase amorfa (hemicelulose e lignina), aumentando, portanto, os domínios cristalinos.

Observa-se um aumento no IC considerável após a realização do pré-tratamento ácido seguido de base (Figura 27). Isso pode ser justificado pela alteração da cristalinidade, associada primeiramente à remoção da hemicelulose pelo H_2SO_4 e, posteriormente, da lignina amorfa pelo NaOH, e consequentemente, pelo aumento no teor de celulose cristalina, e não necessariamente à mudança estrutural da celulose (KIM; LEE; KIM, 2015).

Figura 25 - Difratoograma da biomassa de sorgo *in natura*.

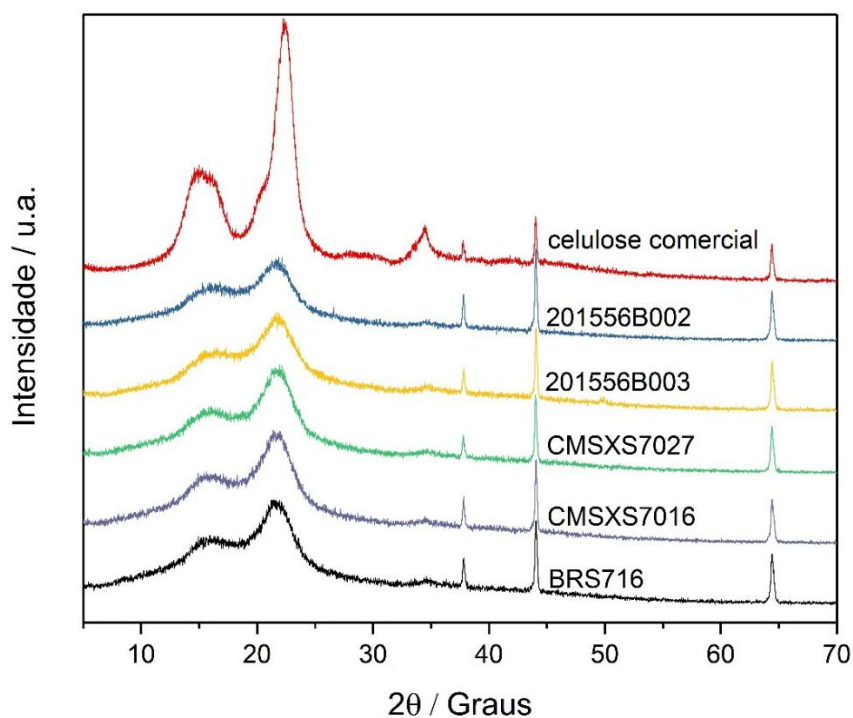
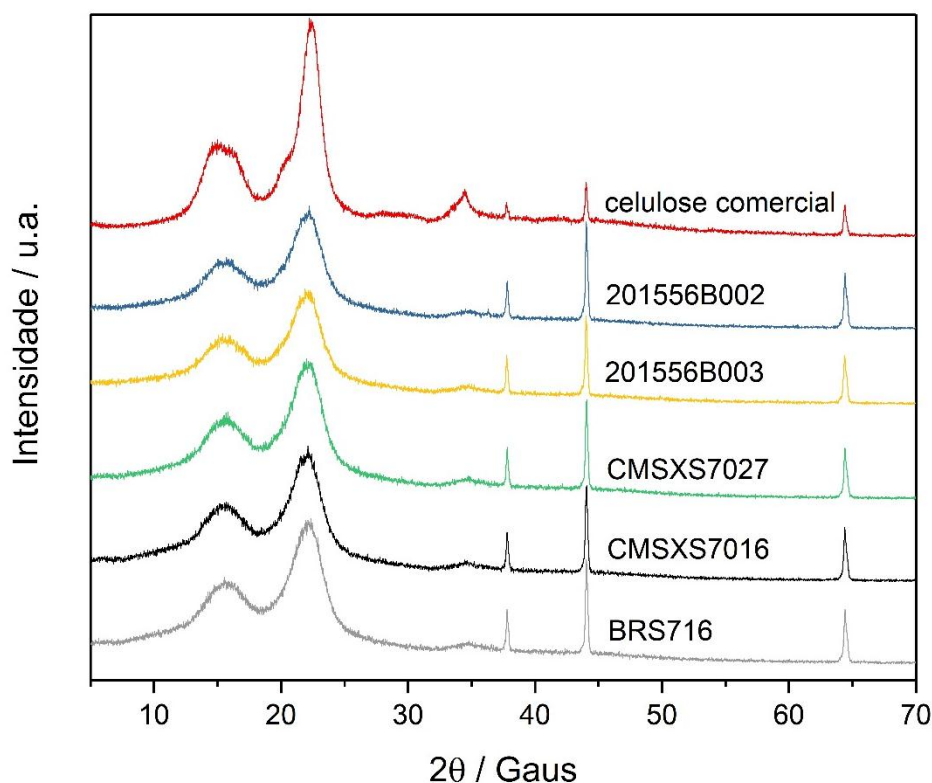
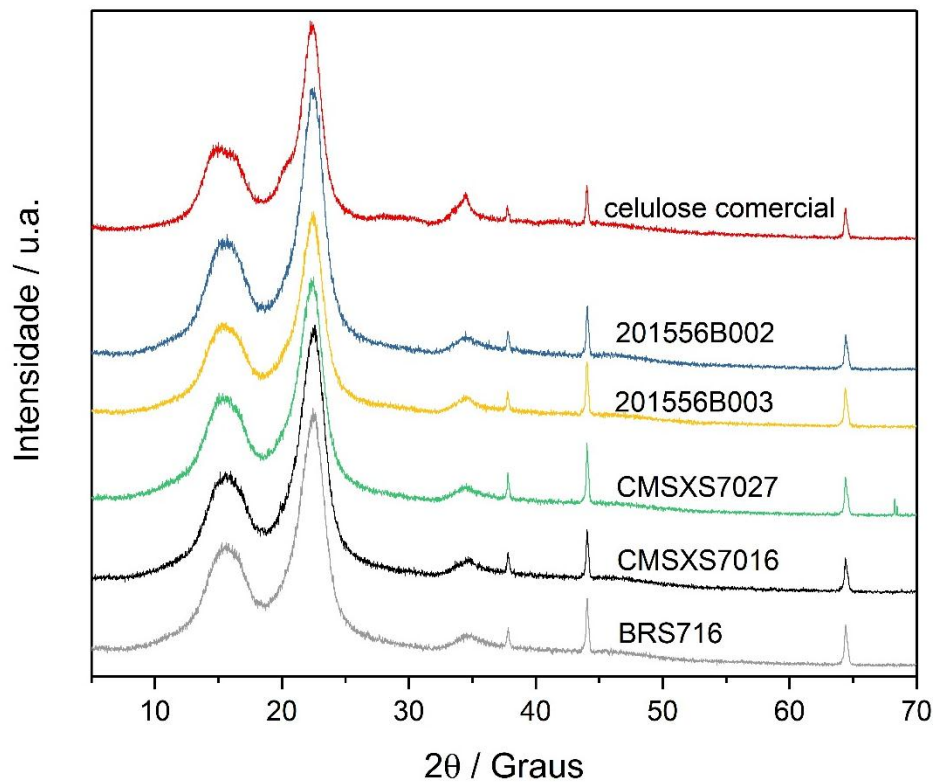


Figura 26 - Difratoograma da biomassa de sorgo após pré-tratamento com ácido.

Há vários relatos na literatura que a redução da cristalinidade da celulose, ou "baixa cristalinidade", resultou em uma maior taxa de bioconversão para as biomassas lignocelulósicas (GOSHADROU *et al.*, 2011; OSTOVAREH *et al.*, 2015). No entanto, isso nem sempre acontece, pois, vários trabalhos mostraram que uma maior digestibilidade é obtida com amostras apresentando uma maior cristalinidade. Nos casos em que uma maior cristalinidade resultou numa digestibilidade mais elevada, outros fatores, por exemplo, área superficial acessível, porosidade, teor de lignina, hemicelulose e tamanho de partícula, foram os que mais influenciaram (PARK *et al.*, 2010). Como exemplo, no pré-tratamento de palha de milho, as partes amorfas são removidas, resultando em um resíduo altamente cristalino, que é passível de hidrólise enzimática, pois possui uma estrutura altamente porosa (KIM e HOLTZAPPLE, 2006). Portanto, a cristalinidade é uma característica importante das biomassas lignocelulósicas para a digestibilidade, mas não o único fator efetivo em todos os casos (KARIMI *et al.*, 2013; SHAFIEI *et al.*, 2015).

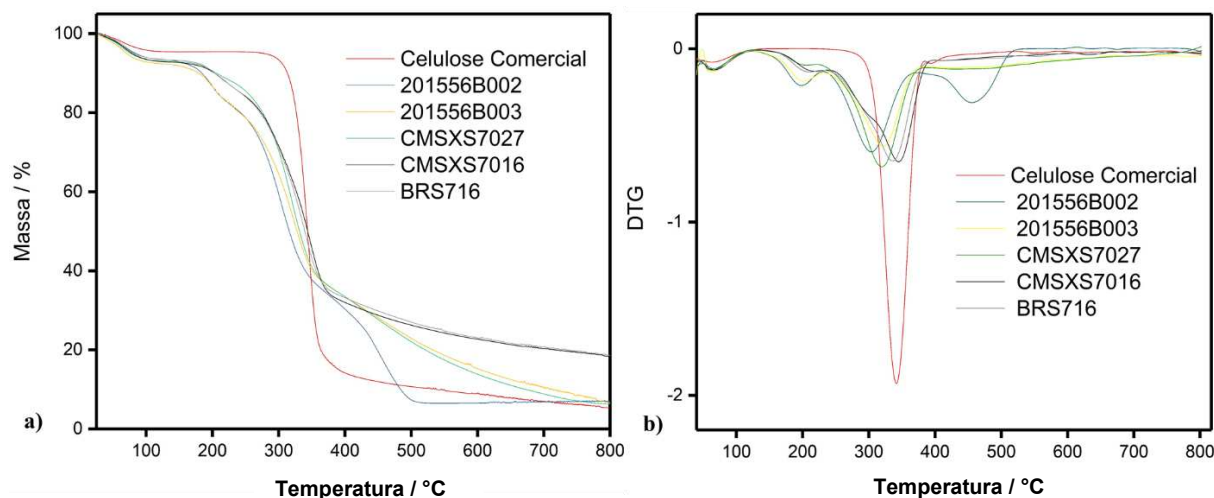
Figura 27 - Difratoograma da biomassa de sorgo após pré-tratamento com ácido seguido de base.



5.9 Análises Térmicas: Termogravimetria / Termogravimetria Derivada - (TG / DTG)

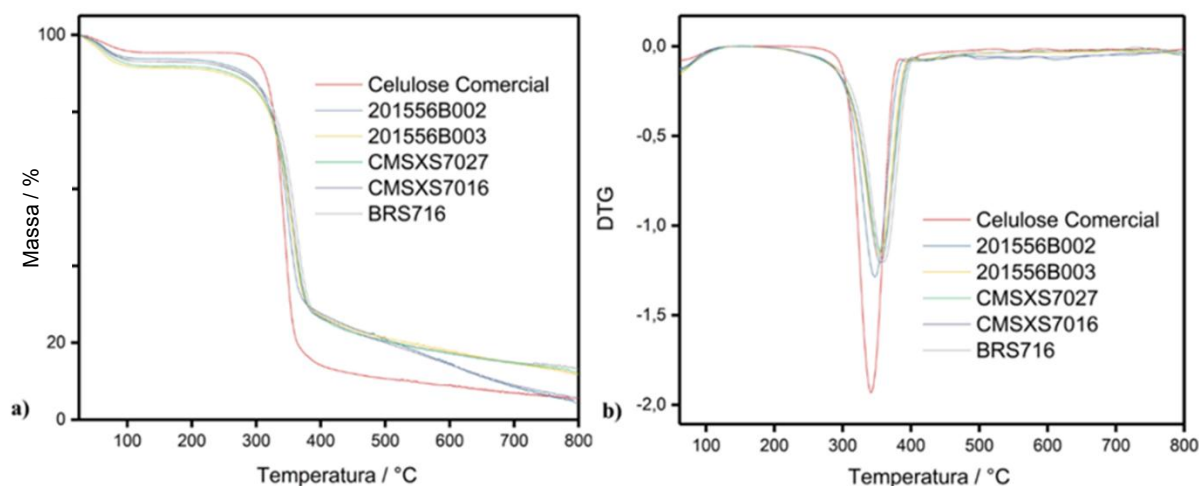
A análise do comportamento térmico de biomassas lignocelulósicas utilizando a termogravimetria (TG) e a termogravimetria derivada (DTG) são importantes, pois relatam a presença de constituintes químicos, tais como hemicelulose, celulose e lignina (PARTHASARATHY *et al.*, 2013). As Figuras 28, 29 e 30 mostram as curvas de TG e DTG para as biomassas de sorgo *in natura* e após os tratamentos.

Figura 28 -. Curvas TG (a) e DTG (b) das biomassas *in natura* de sorgo.



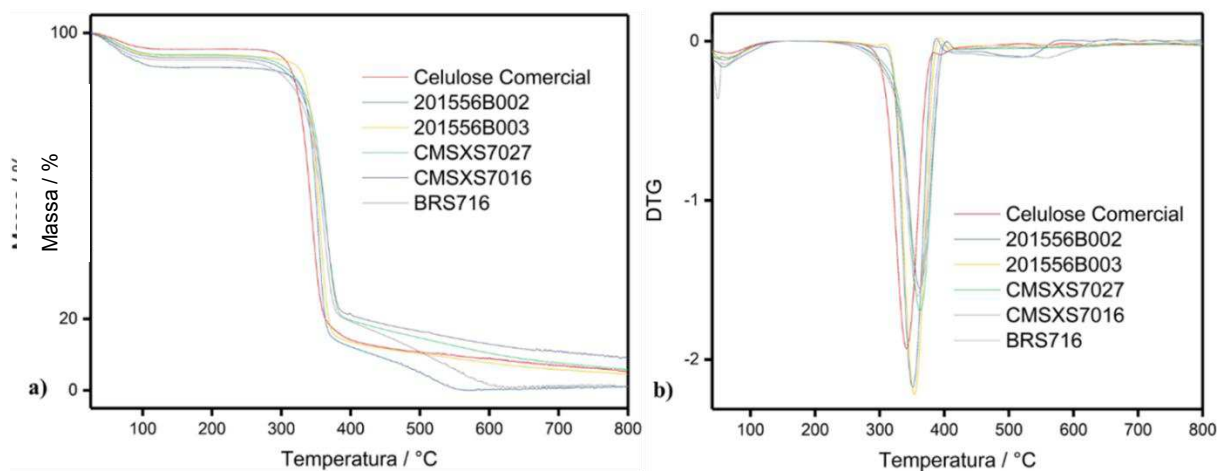
Observa-se que as curvas apresentam um comportamento típico de degradação térmica para biomassas lignocelulósicas, com três etapas bem definidas: liberação de umidade na faixa de 50 a 100 °C, decomposição de carboidratos (hemicelulose e celulose) no intervalo de 250 a 400 °C, acima de 400 °C uma degradação contínua e lenta associada a lignina, e ao final do processo ocorre a formação de carvão e cinzas (RAMBO *et al.*, 2015). A degradação da hemicelulose é evidenciada somente na Figura 28, pois a partir do tratamento ácido ocorre a remoção desse polissacarídeo, o que pode ser confirmado pela ausência de degradação nas faixas anteriores a 290 °C nas figuras 29 e 30, além confirmar os resultados já discutidos a partir das análises de composição e de DRX.

Figura 29 - Curvas TG (a) e DTG (b) das biomassas de sorgo após tratamento ácido.



O pico máximo de degradação pode ser observado na Figura 29, correspondendo a 340 °C, referente a decomposição da celulose, corroborando com o encontrado por Rambo *et al.*, (2015), ao estudarem a termogravimetria de diferentes biomassas.

Figura 30 - Curvas TG (a) e DTG (b) das biomassas de sorgo após tratamento ácido seguido de base.



6 CONCLUSÃO

O sorgo apresenta potencial para produção de biocombustíveis, uma vez que sua biomassa apresenta características favoráveis à conversão energética.

Não houve interação entre os ambientes e os genótipos, para todos os caracteres avaliados, inferindo que não houve influência do meio ambiente sobre o genótipo.

Considerando a possibilidade de duas safras anuais, os 5 híbridos avaliados podem ser qualificados como biomassas promissoras para a indústria de etanol de segunda geração, e capazes de propiciar volumes de álcool superiores aos obtidos com as culturas da cana-de-açúcar e milho por hectare.

A hidrólise catalisada por ácido sulfúrico diluído em condições otimizadas mostrou-se eficaz para a remoção da hemicelulose, assim como a hidrólise ácida seguida por alcalina na remoção de lignina. Portanto, os melhores rendimentos de hidrólise foram obtidos a partir dos materiais tratados, embora tenham apresentado índice de cristalinidade (CI) maior do que o material *in natura*. A acessibilidade da celulose deve ser afetada pela cristalinidade, mas também é provável que seja afetada por vários outros parâmetros, como conteúdo e distribuição de lignina / hemicelulose, porosidade e tamanho de partícula.

Os dois genótipos de sorgo biomassa mutantes *bmr* 201556B002 e 201556B003 apresentaram os menores teores de lignina. Contudo, o sorgo biomassa mutante *bmr* 201556B002 apresentou melhor rendimento de hidrólise. O rendimento de etanol utilizando esse híbrido mutante alcançou 11.567,86 L ha⁻¹, demonstrando que são necessárias menores quantidades de biomassa desse material para obter a mesma quantidade de etanol utilizando outros híbridos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, R.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Kinetic study of acid hydrolysis of sugarcane bagasse. **Journal of Food Engineering**, v. 55, p. 309–318, 2002.

ALBARELLI, J. Q.; ENSINAS, A. V.; SILVA, M. A. S. Product diversification to enhance economic viability of second generation ethanol production in Brazil: The case of the sugar and ethanol joint production. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 92, p. 1470-1481, 2014.

ANNAMALAIA, N.; RAJESWARI, M. V.; BALASUBRAMANIAN, T. Enzymatic saccharification of pretreated rice straw by cellulase produced from *Bacillus carboniphilus* CAS 3 utilizing lignocellulosic wastes through statistical optimization. *Biomass and Bioenergy*, v. 68, p. 151-160, 2014.

ANEEL - Agência Nacional de Energia Elétrica. Atlas de energia elétrica do Brasil, 3ª ed. Brasília, 2008.

ANKON. Thechnology Method 5 – Acid Detergent Fiber in Feeds Filter Bag Technique. Macedon, 2006. p. 2. Disponível em:
http://www.ankom.com/media/documents/ADF_81606_A200.pdf

ANP, 2017a. Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis 2017. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, Rio de Janeiro, 2017a.

ANP, 2017b. Boletim do Etanol nº 09. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, Fevereiro/ 2017b.

ANP, 2018. Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis 2018. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <<http://anp.gov.br>>

ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, p. 163-173, 2014.

ARRIZON, J.; MATEOS, J.; SANDOVAL, G.; AGUILAR, B.; SOLIS, J.; AGUILAR, M. Bioethanol and xylitol production from different lignocellulosic hydrolysates by sequential fermentation. **Journal Food Process Engineering**, v. 35 (3), p. 437–454, 2012.

ARO, E. M. From first generation biofuels to advanced solar biofuels. **Ambio**, v. 45, p. 24-31. 2016.

BALAN, V. Current challenges in commercially producing biofuels from lignocellulosic biomass. **Biotechnology**, 2014.

BAZOTI, S. F.; GOLUNSKI, S.; SIQUEIRA, D. P.; SCAPINI, T.; BARRILLI, E. T.; DIEGO ALEX MAYER, D. A.; BARROS, K. O.; ROSA, C. A.; BORIS U. STAMBUK, B. U.; ALVES JR, S. L.; VALÉRIO, A.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.. Second-generation

ethanol from non-detoxified sugarcane hydrolysate by a rotting wood isolated yeast strain. **Bioresource Technology**, v. 244, Part 1, p. 582-587, 2017.

BENJAMIN, Y.; GARCÍA-APARICIO, M. P.; GÖRGENS, E. F. Impact of cultivar selection and process optimization on ethanol yield from different varieties of sugarcane. **Biotechnology for Biofuels**, v.7:60, 2014.

BERŁOWSKA, J.; PIELECH-PRZYBYLSKA, K.; BALCEREK, M.; DZIEKOŃSKAKUBCZAK, U.; PATELSKI, P.; DZIUGAN, P.; KRĘGIEL, D. Simultaneous Saccharification and Fermentation of Sugar Beet Pulp for Efficient Bioethanol Production. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

BIDEAUX, C.; MONTHEARD, J.; CAMELEYRE, X.; MOLINA-JOUE, C.; ALFENORE, S. Metabolic flux analysis model for optimizing xylose conversion into ethanol by the natural C5-fermenting yeast *Candida shehatae*. **Microbiologia aplicada e biotecnologia**, v. 100, n. 3, p. 1489-1499, 2016.

BINOD, P.; JANU, KU.; SINDHU, R.; PANDEY, A. Hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production. Chapter 10, A. Pandey, C. Larroche, S.C. Ricke, C. Dussap, E. Gnansounou (Eds.), **Biofuels**, Academic Press, Burlington, p. 229-250, 2011.

BHATIA, S. K.; KIM, S-H.; YOON, J-J; YANG, Y-H. Current status and strategies for second generation biofuel production using microbial systems. **Energy Conversion and Management** Volume 148, Pages 1142-1156. 2017.

BNDES. Corredor Bioceânico – Estudos de Demanda. Abril, 2011. Disponível em: <http://www.bndes.gov.br>

BP. Statistical Review of world energy. June, 2015. Disponível em: <https://www.bp.com/content/dam/bp/pdf/energy-economics/statistical-review-2015/bp-statistical-review-of-world-energy-2015-full-report.pdf>

CANABARRO, N. I.; ALESSIO, C.; FOLETTO, E. L.; KUHN, R. C.; PRIAMO, W. L.; MAZUTTI, M. A. Ethanol production by solid-state saccharification and fermentation in a packed-bed bioreactor. **Renewable Energy**, v. 102, p. 9-14, 2017.

CANILHA, L.; SANTOS, V.T.O; ROCHA, G.J.M.; SILVA, J.B.M.; GIULIETTI, M. (2011). A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 38, p. 1467–1475, 2011.

CARDOSO, W. S.; TAVARES, G. P.; QUEIROZ, P. V.; MOTA, S. S.; KASUYA, M. C. M.; QUEIROZ, J. H. Use of sorghum straw (*Sorghum bicolor*) for second generation ethanol production: pretreatment and enzymatic hydrolysis. **Química Nova**, v. 36, No. 5, p.623-627, 2013.

CARRILLO, M. A.; STAGGENBORG, S. A.; PINEDA, J. A. Washing sorghum biomass with water to improve its quality for combustion. *Fuel*, v. 116, p. 427-431, 2014.

CARROLL, A.; SOMERVILLE, C. Cellulosic biofuels. **Annual Review of Plant Biology**, v. 60, p. 165-182, 2009.

CARPIO, L. G. T.; SOUZA, F. S. Optimal allocation of sugarcane bagasse for producing bioelectricity and second generation ethanol in Brazil: Scenarios of cost reductions. **Renewable Energy**, v. 111, p. 771-780, 2017.

CARVALHO, D. M.; QUEIROZ, J. H.; COLODETTE, J. L. Assessment of alkaline pretreatment for the production of bioethanol from eucalyptus, sugarcane bagasse and sugarcane straw. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 932-941, 2016.

CASTAÑEDA-AYARZA, J. A.; CORTEZ, L. A. B. Final and B molasses for fuel ethanol production and some market implications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 70, p. 1059-1065, 2017.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, v.33, n.1, São Paulo, 2010.

CASTRO, F. M. R.; BRUZI, A. T.; NUNES, J. A. R.; PARRELA, R. A. C.; LOMBARDI, G. M. R.; ALBUQUERQUE, C. J. B.; LOPES, M. (2015). Agronomic and Energetic Potential of Biomass Sorghum Genotypes. *American Journal of Plant Science*, v. 6, 2015.

CAVALETT, O.; CHAGAS, M. F.; JUNQUEIRA, T. L.; WATANABE, M. D. B.; BONOMI, A. Environmental impacts of technology learning curve for cellulosic ethanol in Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 106, p. 31-39, 2017.

CHANDRA, R. P.; BURA, R.; MABEE, W. E.; BERLIN, A.; PAN, X.; SADDLER, J. N. Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics. **Biofuels**, v. 108, p. 67-93, 2007.

CHAVES, M. C. C.; GOMES, C. F. S. Avaliação de biocombustíveis utilizando o apoio multicritério à decisão. *Production*, v.24, n°3, p.495-507. 2014.

CHEN, W-H.; YE, S-C.; SHEEN, H-K. Hydrolysis characteristics of sugarcane bagasse pretreated by dilute acid solution in a microwave irradiation environment. **Applied Energy**, v. 93, p. 237-244, 2012.

CHEN, Z. & WAN, C. Biological valorization strategies for converting lignin into fuels and chemicals. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p. 610-621, 2017.

CHERNEY, J. H.; CHERNEY, D. J. R.; AKIN, D. E.; AXTELL, J. D. Potential of Brown-Midrib, Low-Lignin Mutants for Improving Forage Quality. **Advances in Agronomy**, v. 46, p. 157-198, 1991.

CHEROENNET, N.; SUWANMANEE, U. Net Energy Gain and Water Footprint of Corn Ethanol Production in Thailand. **Energy Procedia**, v. 118, p. 15-20, 2017.

CLERGET, B.; DINGKUHN, M.; GOZE, E.; RATTUNDE, H. F. W.; NEY, B. Variability of phyllochron, plastochron and rate of increase in height in photoperiod-sensitive sorghum varieties. **Annals of Botany**, 101, 579-594, 2008. <https://dx.doi.org/10.1093/aob/mcm327>.

COMISSÃO EUROPEIA, 2015 The impact of biofuels on transport and the environment, and their connection with agricultural development in Europe. Directorate General for the Internal

Policies Policy Department B: Structural and Cohesion Policies - Transport and Tourism, Brussels. Disponível em
<[http://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/STUD/2015/513991/IPOL_STU\(2015\)513991_PT.pdf](http://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/STUD/2015/513991/IPOL_STU(2015)513991_PT.pdf)> (acesso 24/10/2017).

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, vol. 2 – Safra 2015/16, nº1, Primeiro Levantamento, Brasília, 2015.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Perspectivas para a agropecuária, Brasília, v.4, p. 1-129, 2016. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v. 4 - Safra 2017/18, n. 2 - Segundo levantamento, Brasília, novembro 2017.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v. 5 - Safra 2017/18, n. 12 - Décimo segundo levantamento, Brasília, setembro, 2018.

CORREA, D. F.; BEYER, H. L.; POSSINGHAM, H. P.; THOMAS-HALLA, S. R.; SCHENK, P. M.. Biodiversity impacts of bioenergy production: Microalgae vs. first generation biofuels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. V. 74, p. 1131-1146, 2017.

CORREDOR, D. Y.; SALAZAR, J. M.; HOHN, K. L.; BEAN, S.; BEAN, B.; WANG, D. Evaluation and Characterization of Forage Sorghum as Feedstock for Fermentable Sugar Production. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 158, p. 164–179, 2009.
<https://doi.org/10.1007/s12010-008-8340-y>

CPRM - Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais. 2004. Disponível em:
<http://www.cprm.gov.br/rehi/atlas/jequitinhonha/relatorios/017.pdf>

CRUZ, C. D. GENES (2013). A Software Package for Analysis in Experimental Statistics and Quantitative Genetics. *Acta Scientiarum Agronomy*, v.35, n.3, p. 271-276, 2013.

DAMASCENO, C. M. B.; PARRELLA, R. A. C.; SIMEONE, M. L. P.; ROBERT E.SCHAFFERT, R. E.; MAGALHÃES, J. V. M. Caracterização bioquímica de genótipos de sorgo quanto ao teor de lignina e análise molecular de rotas metabólicas visando à produção de etanol de segunda geração. XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo, Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo. 2010.

DAMASCENO, C. M. B.; PARRELLA, R. A. C.; SIMEONE, M. L. P.; SCHAFFERT, R. E.; MAGALHÃES, J. V. M. Correlation of Lignin gene expression and biomass quality for biofuel production in Sorghum. Brazilian-International Congress of Genetics, Caxambu/ MG, 2016.

DE SOUZA, A. P.; GRANDIS, A.; LEITE, D. C. C.; BUCKERIDGE, M. S. Sugarcane as a Bioenergy Source: History, Performance, and Perspectives for Second-Generation Bioethanol. **BioEnergy Research**, v. 7, p. 24–35, 2014.

DODD, D.; CANN, I. K. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **GCB Bioenergy**, v. 1, p. 2–17, 2009.

DOMÍNGUEZ, E.; ROMANÍ, A.; DOMINGUES, L.; GARROTE, G. Evaluation of strategies for second generation bioethanol production from fast growing biomass Paulownia within a biorefinery scheme. **Applied Energy**, v. 187, p. 777-789, 2017.

DU, R.; HUANG, R.; SU, R.; ZHANG, M.; WANG, M.; YANG, J.; QI, W.; HE, Z. Enzymatic hydrolysis of lignocellulose: sec-malls analysis and reaction mechanism. **RSC Advances**, v.3, p. 1871-1877, 2013.

DUVERNAY, W.; CHINN, M.S.; YENCHO, G.C. Hydrolysis and fermentation of sweet potatoes for production of fermentable sugars and ethanol. **Industrial Crops Products**, 527–537 p, 2013.

EMBRAPA. Centro Nacional e Pesquisa em Solos. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. Brasília: Embrapa-Solos. 306p. 2006.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Milho e Sorgo. Cultivo do Sorgo. Brasília, 2014.

EPE. RenovaBio: Biocombustíveis 2030, Nota técnica: sustentabilidade. Empresa de Pesquisa Energética, EPE. Rio de Janeiro, 2017.

EPE. Balanço Energético Nacional, 2018. Relatório Síntese, ano base 2017. Empresa de Pesquisa Energética, EPE. Rio de Janeiro, 2018.

FALKOSKI, D. L.; GUIMARÃES, V. M.; ALMEIDA, M. N.; ALFENAS, A. C.; COLODETTE, J. L.; REZENDE, S. T. Chrysoporthe cubensis: A new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 296-305, 2013.

FARHAT, W.; VENDITTI, R.; QUICK, A.; TAHA, M.; MIGNARD, N.; BECQUART, F.; AYOUB, A. Hemicellulose extraction and characterization for applications in paper coatings and adhesives. **Industrial Crops and Products**, v. 107, p. 370-377, 2017a.

FARHAT, W.; VENDITTI, R. A.; HUBBE, M.; TAHA, M.; BECQUART, F.; AYOU, A. A. Review of Water-Resistant Hemicellulose-Based Materials: Processing and Applications. **Chemistry & Sustainability- ChemSusChem – Energy & Materials**, v.10, p. 305 – 323, 2017b.

FARIAS, J. G. Recomendações técnicas para o cultivo e aproveitamento do sorgo-vassoura. Boletim n. 17. Goiânia: EMGOPA, 1989.

FARIAS, D.; ATALA, D. I. P.; MAUGERI FILHO, F. M. Melhorar a produção de bioetanol por *Scheffersomyces stipitis* utilizando fermentação extractiva de retentostat com alta concentração de xilose. **Biochemical Engineering Journal** , v. 121, p. 171-180, 2017.

FARINAS, C. S. A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. São Carlos: Embrapa Instrumentação. Documentos, 54. ISSN: 1518-7179, p. 13, 2011.

FAVARATO, L. F.; PAULA, G. S.; ESPINDULA, M. C.; ROCHA, V. S. Avaliação de linhagens de sorgo vassoura na região de viçosa, MG, Brasil. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v.10, n.1, p.82-86, 2011.

FAVARO, S. P e MIRANDA, C. H. B. Aproveitamento de espécies nativas e seus coprodutos no contexto de biorrefinaria. Documentos 14 - Embrapa Agroenergia. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2013.

FUNAHASHI, R.; ONO, Y.; TANAKA, R.; YOKOI, M.; DAIDO, K.; INAMOCHI, T.; SAITO, T.; HORIKAWA, Y.; ISOGAI, A. Changes in the degree of polymerization of wood celluloses during dilute acid hydrolysis and TEMPO-mediated oxidation: Formation mechanism of disordered regions along each cellulose microfibril. **International Journal of Biological Macromolecules**, Available online, <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.078>>, 2017.

GASTALDI, G.; CAPRETTI, G.; FOCHER, B.; COSENTINO, C. Characterization and properties of cellulose isolated from the Crambe abyssinica hull. **Industrial Crops Products**, v. 8, p. 205-218, 2008

GAMBELLI, D.; ALBERTI, F.; SOLFANELLI, F.; VAIRO, D; ZANOLI, R. Third generation algae biofuels in Italy by 2030: A scenario analysis using Bayesian networks. **Energy Policy**, v. 103, p. 165-178. 2017.

GANDINI, A.; BELGACEM, M. N. Lignins as components of macromolecular materials. **Elsevier**, Amsterdam, p. 143-171, 2008.

GHOSH, S..Biomass & bio-waste supply chain sustainability for bio-energy and bio-fuel production. **Procedia Environmental Sciences**, v. 31, p. 31-39, 2016.

GILBERT, C.; KOKOT, S.; MEYER, U. Application of DRIFT spectroscopy and chemometrics for the comparison of cotton fabrics. **Applied Spectroscopy**, v. 47, p. 741-748, 1993.

GOMES, F. P.; GARCIA, C. H. Statistics applied to agronomic and forest experiments. Piracicaba: FEALQ, 309 p, 2002.

GÓMEZ, E. O.; ROCHA, J. D.; PÉREZ, J. M. M.; PÉREZ, L. E. B. Pirólise rápida de materiais lignocelulósicos para a obtenção de bioóleo. In: Biomassa para energia. Ed. Unicamp. Cap. 11, p. 353-418. Campinas/SP, 2008.

GOSENS, A. L.; ALTAMIRANO, M. H.; CALVO, L. G.; SIMÓN, A. A.; ÁLVAREZ, J.; ACEBES, J. L. Fourier transform mid infrared spectroscopy applications for monitoring the structural plasticity of plant cell walls. **Front. Plant Sci.**, v. 5, p. 303, 2014.

GORDOBIL, O.; MORIANA, R.; ZHANG, L.; LABIDI, J.; SEVASTYANOVA, O. Assesment of technical lignins for uses in biofuels and biomaterials: Structure-related properties, proximate analysis and chemical modification. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 155-165, 2016.

GOSHADROU, A.; KARIMI, K.; TAHERZADEH, M. J. Bioethanol production from sweet sorghum bagasse by *Mucor hiemalis*. **Industrial Crops Products**, v. 34, pp. 1219-1225, 2011.

GOTO, M.; KAMIYA, N. Powerful peracetic acid–ionic liquid pretreatment process for the efficient chemical hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 214, p. 487-495, 2016.

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, nº. 6, 2009.

GRANDIS, A.; DE SOUZA, A. P.; TAVARES, E. Q. P.; BUCKERIDGE, M. S. Using natural plant cell wall degradation mechanisms to improve second generation bioethanol. In: M. C. McCann et al., **Plants and BioEnergy**. Advances in Plant Biology, vol 4. New York, NY, p. 211-230, 2014. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9329-7_13

GUEDES, C. L. B.; ADÃO, D. C.; QUESSADA, T. P.; Dionísio BORSATO, D.; GALÃO, O. F.; MAURO, E. D.; PÉREZ, J. M. M.; ROCHA, J. D. Avaliação de biocombustível derivado do bio-óleo obtido por pirólise rápida de biomassa lignocelulósica como aditivo para gasolina. **Química Nova**, v. 33, nº4, p.781-786. 2010.

GUO, G. L.; CHEN, W. H.; MEN, L. C.; HWANG, W. S. Characterization of dilute acid pretreatment of silvergrass for ethanol production. **Bioresource Technol**, v. 99(14), p.6046-6053, 2008.

GUPTA, S. C. Current status, breeding strategy and future plans on the improvement of sorghum and millet for forage. In: Proceedings of the sixth regional Workshop on sorghum and millet for Southern Africa, Bulawayo, Zimbabwe: v. 19, p. 345-351, 1990.

HARNER, N. K.; WEN, X.; BAJWA, P. K.; AUSTIN, G. D.; HO, C-Y.; HABASH, M. B.; TREVORS, J. T.; LEE, H. Genetic improvement of native xylose-fermenting yeasts for ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 42, p. 1–20, 2015.

HOSSEINI, S. A.; LAMBERT, R.; KUCHERENKO, S.; SHAH, N. Multiscale Modeling of Hydrothermal Pretreatment: From Hemicellulose Hydrolysis to Biomass Size Optimization. **Energy & Fuels**, v. 24 (9), p. 4673–4680, 2010. <DOI: 10.1021/ef9012246>.

IEA. International Energy Agency. Technology Roadmap Biofuels for Transport. 2011.

IDRIS, A. S. O.; PANDEY, A.; RAO, S. S.; Sukumaran, R. K. Cellulase production through solid-state tray fermentation, and its use for bioethanol from sorghum stover. **Bioresource Technology**, v. 242, p. 265-271, 2017.

INMET – Instituto Nacional de Meteorologia, 2018. Disponível em: <<https://www.inmet.gov.br>>

JAISWAL, D.; SOUZA1, A. P.; LARSEN, S.; LEBAUE, D. S.; MIGUEZ, F. E.; SPAROVEK, G.; BOLLERO, G.; BUCKERIDGE, M. S.; LONG, S. P. Brazilian sugarcane

ethanol as an expandable green alternative to crude oil use. **Nature Climate Change**. On-line. 23 out. 2017.

JOHNSON, K. L.; GIDLEY, M. J.; BACIC, A.; DOBLIN, M. S. Cell wall biomechanics: a tractable challenge in manipulating plant cell walls ‘fit for purpose’!. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 49, p. 163-171, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.08.013>

JONSSON, L. J; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*, p. 6:16, 2013. <<https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-16>>

JONSSON, L. J. & MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory byproducts and strategies for minimizing their effects. **Bioresource technology**, v. 199, p. 103-112, 2016.

KAMNEVA, A. A.; TUGAROVAA, A. V.; DYATLOVAA, Y. A.; TARANTILISB, P. A.; GRIGORYEVAC, O. P.; FAINLEIBC, A. M.; DE LUCA, S. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. In Press, Accepted Manuscript, Available online 17 December 2017. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.12.051>

KANNAM, S. K.; OEHME, D. P.; DOBLIN, M. S.; MICHAEL J. GIDLEY, M. J.; BACIC, A.; DOWNTON, M. T. Hydrogen bonds and twist in cellulose microfibrils. **Carbohydrate Polymers**, v. 175, p. 433-439, 2017.

KANG, Q.; TAN, T. Exergy and CO₂ analyses as key tools for the evaluation of bio-ethanol production. **Sustainability**, v. 8, p. 76, 2016.

KAPOOR, K.; GARG, N.; DIWAN, R. K.; VARSHNEY, L.; TYAGI, A. K. (2017). Study the effect of gamma radiation pretreatment of sugarcane bagasse on its physico-chemical morphological and structural properties. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 141, p. 190-195, 2017.

KARIMI, K.; SHAFIEI, M.; KUMAR, R. Progress in physical and chemical pretreatment of lignocellulosic biomass. V.K. **Biofuel Technologies**, p. 53-96, 2013.

KAZAMIA, E.; SMITH, A. G. Assessing the environmental sustainability of biofuels. **Trends in Plant Science**, Volume 19, October 2014, p.615-618, 2014.

KE, J.; CHEN, S. Thermal decomposition of lignin structural modification in termite digested softwood (II). **Fuel**, v. 104, p. 781-787, 2013.

KIM, S.; HOLTZAPPLE, M. T. Effect of structural features on enzyme digestibility of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 583-591, 2006.

KIM, J.S.; LEE, Y.Y.; KIM, T.H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 42–48, 2015.

KOPPRAM, R.; TOMAS-PEJO, E.; XIROS, C.; OLSSON, L. Lignocellulosic ethanol production at high-gravity: Challenges and perspectives. **Trends in Biotechnology**, v. 32, p. 46–53, 2014.

KUHAD, R. C., GUPTA, R., KHASA, Y. P., SINGH, A., & ZHANG, Y. H. P. Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 9, p. 4950-4962, 2011.

KUILA, A.; SHARMA, V. Enzymatic Hydrolysis and Fermentation of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production. **Molecular Enzymology and Drug Target**, v. 2, nº 4, 2016.

KUMAR, R.; MAGO, G.; BALAN, V.; WYMAN, C. Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. **Bioresource Technol**, v. 100, p. 3948-3962, 2009.

KUMAR, A. K.; SHARMA, S. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 4, 2017.

LANGBEHN, R. K.; SILVA, R. G. C.; PANTOJA, L.; Santos, A.S. Otimização do processo de pré-tratamento ácido do bagaço de sorgo sacarino (Shorgum bicolor (L.) Moench) para produção de bioetanol. In: XVIII Seminari Acadèmic APEC, 2013, Barcelona. Anais do XVIII Seminário Acadêmico APEC - Desafios contemporâneos: Ciências, Culturas e Tecnologias em Tempos de Crise, 2013.

LANGBEHN, R. K.; BRITO, P. L.; PANTOJA, L.; Santos, A.S. Otimização dos pré-tratamentos ácido e alcalino do bagaço de sorgo sacarino para produção de bioetanol de segunda geração. In: 9º Congresso Internacional de Bioenergia, 2014, São Paulo. 9º Congresso Internacional de Bioenergia - Anais, 2014.

LAOTHANACHAREON, T.; BUNTERNGSOOK, B.; SUWANNARANGSEE, S.; EURWILAICHITR, L.; CHAMPREDA, V. Synergistic action of recombinant accessory hemicellulolytic and pectinolytic enzymes to *Trichoderma reesei* cellulase on rice straw degradation. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 682-690, 2015.

LAVARACK, B. P.; GRIFFIN, G. J.; RODMAN, D. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, p. 367-380, 2002.

LENGOWSKI, E. C.; MUNIZ, G. I. B.; NISGOSKI, S.; MAGALHÃES, W. L. E. Avaliação de métodos de obtenção de celulose com diferentes graus de cristalinidade. **Scientia Florestalis**, v. 41, p. 185-194, 2013.

LI, H-Y.; CHEN, X.; LI, Y-J.; CAO, X-F.; SUN, S-N.; SUN, R-C. The effect of ionic liquids pretreatment on the distribution and structure of alkali-soluble hemicelluloses from Eucalyptus. **Separation and Purification Technology**, v. 191, p. 364-369, 2018.

LINDMAN, B.; MEDRONHO, B.; ALVES, L.; COSTA, C.; EDLUND, H.; NORGRENA, M. The relevance of structural features of cellulose and its interactions to dissolution, regeneration, gelation and plasticization phenomena. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 19, p. 23704-23718, 2017.

LIU, R.; YU, H.; HUANG, Y. Structure and morphology of cellulose in wheat straw. **Cellulose**, v. 12, p. 25-34, 2005.

LIU, G.; ZHANG, Q.; LI, H.; QURESHI, A. S.; ZHANG, J.; BAO, X.; BAO, J. Dry biorefining maximizes the potentials of simultaneous saccharification and co-fermentation for cellulosic ethanol production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 115, p. 60-69, 2017. doi: 10.1002/bit.26444.

LLOYD, J.B.; WHELAN, W.J. An improved method for enzymic determination of glucose in the presence of maltose. **Analytical Biochemistry**, v.30, p. 467-470, 1969.

LU, J.; LI, Xue Zhi; ZHAO, J.; QU, Y. Enzymatic Saccharification and Ethanol Fermentation of Reed Pretreated with Liquid Hot Water. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.144, p.539-547, 2013. DOI: 10.1155/2012/276278

MAGALHÃES, K. S.; NEGRI, B. F.; SOUSA, S. M. Análise morfológica do sistema radicular do painel de diversidade de milho da Embrapa Milho e Sorgo. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, nº64. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2013.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; RODRIGUES, J. A. S. Ecofisiologia. In: **Cultivo do Sorgo** – Embrapa Milho e Sorgo, Sistema de produção versão eletrônica, 6ª ed. Set./2010. Disponível em http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/sorgo_6_ed/ecofisiologia.htm

MAGALHÃES, P. C. C.; SOUZA, T. C.; SCHAFFERT, R. E. Ecofisiologia. In: **Sistema de Produção**, 9ª edição: Cultivo de Sorgo, 2015. Disponível em: <
<https://www.spo.cnpia.embrapa.br/>>

MAGALHÃES, R. T.; GONÇALVES, L. C.; BORGES, I.; RODRIGUES, J. A. S.; FONSECA, J. F. Produção e composição bromatológica de vinte e cinco genótipos de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). **Arq.Bras.Med. Vet Zoo**, v, 62, p.747-751, 2010.

MAPA. Produção de cana-de-açúcar, açúcar e etanol. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2018. Disponível em <
<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/agroenergia/producao>>, Acesso em 11/09/2018.

MAPA. Produção de cana-de-açúcar, açúcar e etanol. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2019. Disponível em <
http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/agroenergia/arquivos-producao/001PRODUOBRASILEIRADECANADEACARACAREETANOL_24042019.pdf>, Acesso em 26/04/2019.

MARQUES, F. O alvo é o bagaço. In: Pesquisa FAPESP, ed. 163, p. 16-20. Set./ 2009.

MARTÍNEZ-SANZ, M.; PETTOLINO, F.; FLANAGAN, B.; GIDLEY, M. J.; GILBERT, E. P. **Carbohydrate Polymers**, v. 175, p. 450-463, 2017.

MCCREADY, R. M.; GUGGOLZ, J.; SILVIERA, V.; OWENS, H. S. Determination of Starch and Amylose in Vegetables. **Analytical Chemistry**, v. 22, p. 156-158. 1950.

MENDES, F. M.; DIAS, M. OS.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F.; J.C. SANTOS, J. C.; BONOMI, A. Techno-economic impacts of varied compositional profiles of sugarcane

experimental hybrids on a biorefinery producing sugar, ethanol and electricity. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 125, p. 72-78, 2017.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, Issue 4, p. 522-550, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2012.02.002>

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. v.31, n.3, p.426-428, 1959.

MIRANDA, C. S.; FIUZA, R. P.; CARVALHO, R. F.; M. JOSÉ, N. Effect of surface treatment on properties of bagasse piassava fiber *Attalea funifera* Martius. **Química Nova**, v. 38, n.2, 2015. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140303>

MONOCHIO, C. ANDRADE, B. R.; R.P. RODRIGUEZ, R.P.; MORAES, B. S. Ethanol from biomass: A comparative overview. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 80, p. 743-755, 2017.

MOREIRA, J. R. Obtenção de etanol a partir de material celulósico. In: Rosillo-Cale, F.; Bajay, S. V.; Rothman, H. (ed.). *Uso da biomassa para produção de energia na indústria brasileira*. Campinas: UNICAMP, 448p., 2005.

MUPONDWA, E.; LI, X.; TABIL, L.; SOKHANSANJ, S.; ADAPA, P. Status of Canada's lignocellulosic ethanol: Part I: Pretreatment technologies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 72, p. 178-190, 2017a.

MUPONDWA, E.; LI, X.; TABIL, L.; SOKHANSANJ, S.; ADAPA, P. Status of Canada's lignocellulosic ethanol: Part II: Hydrolysis and fermentation technologies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 1535-1555, 2017b.

NAGARAJAN, S.; SKILLEN, N. C.; IRVINE, J. T S.; LAWTON, L. A.; ROBERTSON, P. K. J. Cellulose II as bioethanol feedstock and its advantages over native cellulose. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 77, p. 182-192, 2017.

NEGAHDAR, L.; DELIDOVICH, D.; PALKOVITS, R. Aqueous-phase hydrolysis of cellulose and hemicelluloses over molecular acidic catalysts: Insights into the kinetics and reaction mechanism. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 184, p. 285-298, 2016.

NEUREITER, M.; DANNER, H.; THOMASSER, C.; SAIDI, B.; BRAUN, R. Dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 98, p. 49-58, 2002.

OECD-FAO. OECD-FAO Agricultural Outlook 2015-2014. OECD/Food and Agriculture Organization of the United Nations, Paris, 2015.

OECD/FAO. OECD-FAO Agricultural Outlook 2016-2025. OECD/Food and Agriculture Organization of the United Nations, Paris, 2016.

OLIVEIRA, I. C. S.; SOUZA, L. S.; SIMEONE, M. L. F.; PARRELLA, R. A. C.; MAY, A. SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA PIBIC/CNPq – 2015.

OLSON, S. N.; RITTER, K.; ROONEY, W.L.; KEMANIAN, A.; MCCARL, B.A.; ZHANG, Y.; HALL, S.; PACKER, D.; MULLET, J. High biomass yield energy sorghum: developing a genetic model for C4 grass bioenergy crops. *Biofuels Bioproducts e Biorefining*, v. 6, p. 640-655, 2012. <https://doi.org/10.1002/bbb.1357>

OSTOVAREH, S.; KARIMI, K.; ZAMANI, A. Efficient conversion of sweet sorghum stalks to biogas and ethanol using organosolv pretreatment. *Industrial Crops Products*, v. 66, p. 170-177, 2015.

OUDIANI, A. E.; MSAHLI, S.; SAKLI, F. In-depth study of agave fiber structure using Fourier transform infrared spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, v. 164, p. 242-248, 2017.

PANDEY, K. K. A Study of Chemical Structure of Soft and Hardwood and Wood Polymers by FTIR Spectroscopy. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 71, p. 1969–1975, 1999.

PARK, S.; BAKER, J. O.; HIMMEL, M. E.; PARILLA, P. A.; JOHNSON, D. K. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnology for Biofuels*, v. 3, 2010. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-10>

PARRELLA, R. A. C.; MENEGUCI, J. L. P.; RIBEIRO, A.; SILVA, A. R.; PARRELLA, N. D.; RODRIGUES, J. A. S.; TARDIN, F. D.; SCHAFFERT, R. E. Desempenho de cultivares de sorgo sacarino em diferentes ambientes visando a produção de etanol. XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 2010, Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo. 2010a.

PARRELLA, R. A. DA C., RODRIGUES, J. A. S.; TARDIN, F. D.; DAMASCENO, C. M. B.; SCHAFFERT, R. E. Desenvolvimento de híbridos de sorgo sensíveis ao fotoperíodo visando alta produtividade de biomassa. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, 28. Sete Lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo, 2010b.

PARRELLA, R. A.; SCHAFFERT, R. E.; MAY, A.; EMYGDIO, B.; PORTUGAL, A. F.; DAMASCENO, C. M. B. Desempenho agrônômico de híbridos de sorgo biomassa. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, 41. Sete Lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo, 2011.

PARRELLA, R. A. C. Cultivares. In: MAY, A.; SILVA, D. D. da; SANTOS, F. C. dos (Ed.). Cultivo do sorgo biomassa para a cogeração de energia elétrica. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, p. 65, 2013.

PARRELLA, R. A. da C.; MENEZES, C. B. de; RODRIGUES, J. A. S.; TARDIN, F. D.; PARRELLA, N. N. L. D.; SCHAFFERT, R. E. Cultivares. In: BORÉM, A.; PIMENTEL, L. D.; PARRELLA, R. A. da C. (Ed.). *Sorgo: do plantio à colheita*. Viçosa, MG: UFV, cap. 7, p. 169-187. 2014.

PARTHASARATHY, P.; K. NARAYANAN, K. S.; AROCKIAM, L. Study on kinetic parameters of different biomass samples using thermo-gravimetric analysis. *Biomass and Bioenergy*, v. 58, p. 58-66, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.08.004>

PATTATHIL, S.; HAHN, M. G.; DALE, B. E.; CHUNDAWAT, S. P. Insights into plant cell wall structure, architecture, and integrity using glycome profiling of native and AFEXTM-

pre-treated biomass. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, p. 4279–4294, 2015.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erv107>

PATEL, H.; CHAPLA, D.; SHAH, A. (2017). Bioconversion of pretreated sugarcane bagasse using enzymatic and acid followed by enzymatic hydrolysis approaches for bioethanol production. **Renewable Energy**, v. 109, p. 323-331, 2017.

PEDERSEN, J. F.; VOGEL, K. P.; FUNNELL, D. L. Impact of reduced lignin on plant fitness. **Crop Science**, v.45, p.812-819, 2005.

PENG, Y.; WU., S. The structural and thermal characteristics of wheat straw hemicellulose. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 88, ed. 2, p. 134-139, 2010.

PEREIRA FILHO, I. A.; RODRIGUES, J. A.S. **Sorgo: o produtor pergunta, a Embrapa responde. Coleção 500 perguntas, 500 respostas**. Brasília, DF: Embrapa, 2015. 327 p.

PEREIRA JR., N. **Investigation of d-xylose fermenting yeast**. Ph. D. Thesis. Department of chemistry the University of Manchester, UK, 1991.

PHITSUWAN, P.; SAKKA, K.; RATANAKHANOKCHAI, K. Structural changes and enzymatic response of Napier grass (*Pennisetum purpureum*) stem induced by alkaline pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 218, p.247-256, 2016.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental**. São Paulo: Nobel, 1985. 467 p.

PORTER, K. S.; AXTELL, J. D.; LECHTENBERG, V. L.; COLENBRANDER, V. F. Phenotype, ber composition, and in vitro dry matter disappearance of chemically induced brown midrib (*bmr*) mutants of sorghum. **Crop Science**, v.18, p.205–209, 1978.

PURCINO, A. A. C. Sorgo sacarino na Embrapa; histórico, importância e usos. In: **Agroenergia em Revista**. Ano II, nº 3, agosto/2011.

RAELE, R.; BOAVENTURA, J. M. G.; FISCHMANN, A. A.; SARTURI, G. Scenarios for the second generation ethanol in Brazil. **Technological Forecasting and Social Change**, v. 87, p. 205-223, 2014.

RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B.; SANTOS, J.B.; NUNES, J.A.R. Aplicações da genética quantitativa no melhoramento de plantas autógamas. Lavras: Editora UFLA, 522p., 2012.

RAMBO, M. K. D.; RAMBO, M. C. D.; RODRIGUES, K. J. C.; ALMEIDA, G. P. A. Study of thermo-gravimetric analysis of different lignocellulosic biomass using principal component analysis. **Ciência e Natura**, v. 37 n. 3, p. 862-868, 2015.
<http://dx.doi.org/105902/217946018332>

RASTOGI, M.; SHRIVASTAVA, S. Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 80, p. 330-340, 2017.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7ª ed. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro. 830 p. 2007.

RAVINDRAN, R. & JAISWAL, A.K. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: Challenges and opportunities. **Bioresource technology**, v. 199, p. 92-102, 2016.

REIS, A. L. S.; DAMILANO, E. D. D.; MENEZES, R. S. C.; MORAIS JR, M. A. Second-generation ethanol from sugarcane and sweet sorghum bagasses using the yeast *Dekkera bruxellensis*. **Industrial Crops and Products**, v. 92, p. 255-262, 2016.

REN21. Renewables 2017 Global Status Report. Paris: REN21, 2017. Disponível em <<http://www.ren21.net/gsr-2017/>> Acesso em 26/10/2017.

REVIN, V.; ATYKYAN, N.; ZAKHARKIN, D. Enzymatic hydrolysis and fermentation of ultradispersed wood particles after ultrasonic pretreatment. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 20, p. 14-19, 2016.

RFA. Ethanol industry statistics. Renewable Fuels Association – RFA. Washington, DC, USA, 2015.

RFA. Pocket Guide to ETHANOL 2016. Renewable fuel association. Disponível em: <<http://www.ethanolrfa.org/wp-content/uploads/2016/02/10823-RFA.pdf>> Acesso em 26/10/2017.

RIBAS, P. M. Importância Econômica. In: Cultivo do Sorgo – Embrapa Milho e Sorgo, Sistema de produção versão eletrônica, 3ª ed. Set./2007. Disponível em http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/sorgo_3_ed/importancia.htm

ROBERTSON, J.B.; VAN SOEST, P.J. (1981) The detergent system of analysis and its application to human foods. In: JAMES, W.P.T.; THEANDER, O. (Eds.). The analysis of dietary fiber in food. New York: Marcel Dekker, p123-158, 1981.

ROSSI, E.; LINDINO, C. A.; SANTOS, K. G.; BARICCATTI, R. A.; CREMONEZ, P. A.; ANTONELI, J.; NADALETI, W. C. Pré-tratamentos na produção de etanol de segunda geração. **Revista Monografias Ambientais - REMOA** v.13, n.4, p.3516-3522, 2014.

SAINI, R.; SAINI, J. K.; ADSUL, M.; PATEL, A. K.; MATHUR, A.; TULLI, D.; SINGHANIA, R. R. Enhanced cellulase production by *Penicillium oxalicum* for bio-ethanol application **Bioresour. Technol.**, v.188, p. 240-246, 2015.

SAKIMOTO, K.; KANNA, M.; MATSUMURA, Y. Kinetic model of cellulose degradation using simultaneous saccharification and fermentation. **Biomass and Bioenergy**, v. 99, p. 116-121, 2017.

SALLES-FILHO, S. L. M.; CASTRO, P. F. D.; BIN, A.; EDQUIST, C.; FERRO, A. F. P.; CORDER, S. Perspectives for the Brazilian bioethanol sector: The innovation driver. **Energy Policy**, v. 108, p. 70-77, 2017.

SANDHU, A. P. S.; RANDHAWA, G. S.; DHUGGA, K. S. Plant Cell Wall Matrix Polysaccharide Biosynthesis. **Molecular Plant**, v. 2, p. 840-850, 2009.

SANTOS, D. A.; OLIVEIRA, M. M.; CURVELO, A. A. S.; FONSECA, L. P.; PORTO, A. L. M. Hydrolysis of cellulose from sugarcane bagasse by cellulases from marine-derived fungi strains. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 121, p. 66-78, 2017.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J.H. DE; COLODETTE, J.L.; FERNANDES, S.A.; GUIMARÃES, V.M. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química nova**, v.35, n.5, p.1004–1010, 2012.

SANTOS, F. C.; FILHO, M. R. A.; RESENDE, A. V.; OLIVEIRA, A. C.; GOMES, T. C.; OLIVEIRA, M. S. Adubações nitrogenada e potássica no sorgo biomassa -produtividade e qualidade de fibra. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.13, n.1, p. 1-13, 2014.

SANTOS, F. G.; CASELA, C. R.; WAQUIL, J. M. Melhoramento de sorgo. In: Borém, A. (Ed). Melhoramento de espécies cultivadas. 2. Ed. p. 605-658, Viçosa, MG: UFV, 2005.

SATTLER, S. E.; FUNNELL-HARRIS, D. L.; PEDERSEN, J. F. Brown midrib mutations and their importance to the utilization of maize, sorghum, and pearl millet lignocellulosic tissues. **Plant Science**, v. 178, p. 229-238, 2010.

SAHA, B. C.; ITEN. B. L.; COTTA, M.; WU, Y. V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of rice hulls to ethanol. **Biotechnol Prog**, v.21, p.3816-3822, 2005.

SHAFIEI, M.; KUMAR, R.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic biomass. Karimi, K. (Ed.), Lignocellulose-Based Bioproducts, **Springer International Publishing**, p. 85-154, 2015.

SHAHZADI, T.; MEHMOOD, S.; IRSHAD, M.; ANWAR, Z.; AFROZ, A.; ZEESHAN, N.; RASHID, U.; SUGHRA, K. Advances in lignocellulosic biotechnology: A brief review on lignocellulosic biomass and cellulases. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, n. 5, p. 246-251, 2014.

SIL, F. e NETO, J. S. Brasil vai produzir etanol de segunda geração em 2014. Publicado em 21/12/2013. Disponível em: <http://www.inctdobioetanol.com.br/>

SILVA, A. T. B.; SPERS, R. G.; WRIGHT, J. T. C.; COSTA, P. R. Cenários propectivos para o comércio internacional de etanol em 2020. **Revista de Administração**, vol.48, nº 4. São Paulo, 2013.

SILVA, A. F., [et al.] Sorgo granífero: estenda sua safrinha com segurança. Editor técnico, Cicero Beserra de Menezes. Documentos 176/ Embrapa Milho e Sorgo – Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2015.

SIMEONE, M. L. F.; PARRELLA, R. A. da C.; MAY, A.; SCHAFFERT, R. E. Produção e caracterização de pellets de sorgo biomassa. II Congresso Internacional de Biomassa, Paraná/ Curitiba, 2017.

SIMEONE, M. L. F.; DAMASCENO, C. M. B.; FIETTO, L. G.; CAMPOS, V. J.; PARRELLA, R. A. C.; SCHAFFERT, R. E. Genótipos de Sorgo com Potencial para

Sacarificação. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, nº 182, Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2018.

SINDHU, R.; KUTTIRAJA, M.; BINOD, P.; JANU, K. U.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. Dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification of sugarcane tops for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10915-10921., 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.066>

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 76-82, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.030>

SINGH, Y. D.; MAHANTA, P; BORA, U. Comprehensive characterization of lignocellulosic biomass through proximate, ultimate and compositional analysis for bioenergy production. **Renewable Energy**, v. 103, p. 490-500, 2017.

SMITH, C. W.; FREDERIKSEN, R. A. Sorghum: origin, history, technology, and production. **Wile Series in Crop Science**, Series Editor Texas A & M University, 2000, 824p.

SOUZA, O.; SCHULZ, M. A.; FISCHER, G. A. A.; SELLIN, T. M. W. Energia alternativa de biomassa: bioetanol a partir da casca e da polpa de banana. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. vol.16, nº.8. Campina Grande, ago. 2012.

SOUZA, L. F.; PARRELLA, R. A. C.; SANTOS, C. V.; SOUZA, V. F.; NÁDIA NARDELY LACERDA DURÃES PARRELLA, N. N. L. D.; SCHAFFERT, R. E. Productive performance of biomass sorghum hybrids in different environments. XXXI NATIONAL CONGRESS OF MAIZE AND SORGHUM, “Milho e Sorgo: inovações, mercados e segurança alimentar”. Bento Gonçalves/ RS, 2016.

SRIVASTAVA, N.; SRIVASTAVA, M.; MISHRA, P. K.; GUPTA, V. K.; MOLINA, G.; RODRIGUEZ-COUTO, S.; MANIKANTA, A.; RAMTEKE, P. W. Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Available online, 2017.

SUN, R.; TOMKINSON, J. Separation and characterization of cellulose from wheat straw. *Separation Science and Technol.* v. 39, p. 391-411, 2005.

SUN, Z., SHUPE, A., LIU, T., HU, R., AMIDON, T. E., & LIU, S. Particle properties of sugar maple hemicellulose hydrolysate and its influence on growth and metabolic behavior of *Pichia stipitis*. **Bioresource technology**, v. 102, n. 2, p. 2133-2136, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 3 ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 3 ed, Ed. Artmed: Porto Alegre, 2004.

TALEBNIA, F.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, Issue 13, p. 4744-4753, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.080>

TEIXEIRA, T. S.; SIQUEIRA, F. G.; BATISTA, R. D. Enzimas microbianas de desconstrução da parede celular: novas abordagens. **Revista Eletrônica de Energia**, v. 6, n. 1, 2016.

TIZAZU, B. Z.; MOHOLKAR, V. S. Kinetic and Thermodynamic Analysis of Dilute Acid Hydrolysis of Sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, Available online: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.032>, 2017.

TRAN, L. H., YOGO, M., OJIVA, H., IDOTA, O., HAWAI, K., SUZUKI, T.; TAKAMIZAWA, K. The production of xylitol by enzymatic hydrolysis of agricultural wastes. **Biotechnol Bioprocess Engineering**, v. 9, p.223–228, 2004.

UMAGILIYAGE, A. L.; CHOUDHARY, R.; LIANG, Y.; HADDOCK, J.; G. WATSON, D. G. Laboratory scale optimization of alkali pretreatment for improving enzymatic hydrolysis of sweet sorghum bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 977-986, 2015.

UNICA. Importação mensal de etanol pelo Brasil. União da Indústria de cana-de-açúcar. 2017. Disponível em < <http://www.unicadata.com.br/listagem.php?idMn=52> > Acesso 06/09/2017.

VAN DER POL, E. C., BAKKER, R. R., BAETS, P., & EGGINK, G. By-products resulting from lignocellulose pretreatment and their inhibitory effect on fermentations for (bio) chemicals and fuels. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 23, p. 9579-9593, 2014.

VAN DER WEIJDE, T.; TORRES, A.F.; DOLSTRA, O.; DECHESNE, A.; VISSER, R.G.F.; TRINDADE, L.M. (2016) Impact of Different Lignin Fractions on Saccharification Efficiency in Diverse Species of the Bioenergy Crop Miscanthus. *Bioenergy Res.* v. 9, p.146-156, 2016.

VAN SOEST, P.J. Nutritional ecology of the ruminant, 2nd ed. Ithaca, NY: Cornell University, 1994. 476p.

WAN, C.; ZHOU, Y.; LI, Y. Liquid hot water and alkaline pretreatment of soybean straw for improving cellulose digestibility. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 6254-6259, 2011.

WALTON, S.; VAN HEININGEN, A.; VAN WALSUM, P. Inhibition effects on fermentation of hardwood extracted hemicelluloses by acetic acid and sodium. **Bioresource technology**, v. 101, n. 6, p. 1935-1940, 2010.

XU, F.; YU, J.; TESSO, T.; DOWELL, F.; WANG, D. Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: A mini-review. **Applied Energy**, v. 104, p. 801-809, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.12.019>

XUE, D-S.; WANG, J-B.; YAO, S-J. High production of β -glucosidase from a marine *Aspergillus niger* immobilized on towel gourd vegetable sponges. **Chinese Chemical Letters** v. 26, p. 1011-1015, 2015.

YAN, Z.; LI, J.; CHANG, S.; CUI, T.; JIANG, Y.; YU, M.; ZHANG, L.; ZHAO, G.; QI, P.; LI, S. Lignin relocation contributed to the alkaline pretreatment efficiency of sweet sorghum bagasse. **Fuel**, v. 158, p. 152-158, 2015.

ZHAO, X.; PENG, F.; CHENG, K.; LIU, D. Enhancement of the enzymatic digestibility of sugarcane bagasse by alkali-peracetic acid pretreatment. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 44, p. 17–23, 2009.

ZHOU, Z.; YOU, Y.; LEI, F.; LI, P.; JIANG, J.; ZHU, L.(2017) Enhancement of enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse by pretreatment combined green liquor and sulfite. **Fuel**, v. 203, p. 707-714, 2017.

ANEXO A - Análise de variância conjunta de cinco híbridos de sorgo biomassa nos dois anos de cultivo. Sete Lagoas e Couto de Magalhães de Minas, MG, safras 2015/2016 e 2016/2017.

Modelo: $Y_{ijk} = m + (B/L)/A_{jkm} + G_i + A_j + L_k + GA_{ij} + GL_{ik} + AL_{jk} + GAL_{ijk} + E_{ijk}$

Quadrado médio											
FV	GI	ALT	PMV	PMS	FDN	FDA	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Lipídeo	Cinzas
Bloco/Amb/ Ano	8	0,31	340,13	36,81	6,79	9,41	5,35	7,48	1,10	0,53	0,17
Híbridos	4	0,77**	1176,34**	329,88**	47,33**	41,55**	8,69 ^{NS}	12,60*	16,58**	0,71	1,56**
Anos	1	0,47 ^{NS}	52,75 ^{NS}	76,68 ^{NS}	216,96**	234,12**	142,92**	0,32 ^{NS}	11,19*	38,51	28,14**
Ambientes	1	9,39**	37,86 ^{NS}	58,43 ^{NS}	358,82**	285,94**	87,72**	4,13 ^{NS}	56,91**	65,27	0,59 ^{NS}
Hib.x Anos	4	0,73 ^{NS}	444,39 ^{NS}	51,14 ^{NS}	1,81 ^{NS}	6,07 ^{NS}	3,73 ^{NS}	7,93 ^{NS}	0,36 ^{NS}	0,69	0,16 ^{NS}
Hib.x Amb.	4	0,15 ^{NS}	488,18 ^{NS}	44,81 ^{NS}	11,36 ^{NS}	7,29 ^{NS}	3,98 ^{NS}	4,80 ^{NS}	0,97 ^{NS}	0,79	0,24 ^{NS}
AnosxAmb.	1	0,03 ^{NS}	336,50 ^{NS}	150,16 ^{NS}	2,06 ^{NS}	5,77 ^{NS}	7,92 ^{NS}	0,93 ^{NS}	0,17 ^{NS}	20,85	41,35**
Hífb.xAnosx Amb.	4	0,25 ^{NS}	444,79 ^{NS}	23,48 ^{NS}	15,13 ^{NS}	4,37 ^{NS}	1,39 ^{NS}	4,41 ^{NS}	1,26 ^{NS}	0,72	0,08 ^{NS}
Resíduo	32	0,13	184,39	21,37 ^{NS}	6,22	6,88	5,13	3,25	0,56	0,18	0,11
Média		4,15	84,24	26,62	68,07	41,32	35,34	26,75	5,97	2,52	2,90
CV		8,93	16,11	17,36	3,66	6,35	6,41	6,74	12,55	17,14	11,63

Hib. x Anos= interação genótipo anos; Hífb.x Amb.= interação genótipo ambiente; Anos x Amb.= interação anos com ambientes; Hífb.x Anos x Amb= interação híbrido com anos e ambientes; ALT= altura de plantas (m); PMV= produção de massa verde (t ha⁻¹); PMS= produção massa seca (t ha⁻¹); FDN= fibra em detergente neutro; FDA= fibra em detergente ácido; celulose, hemicelulose e lignina (%)

^{ns}, **, * = não significativo, significativo p<0,01 e p<0,05, respectivamente pelo teste F.

ANEXO B - Análise de variância conjunta da composição lignocelulósica dos cinco híbridos de sorgo biomassa após o pré-tratamento ácido.

Modelo: $Y_{ijk} = m + B/A_{jk} + G_i + A_j + GA_{ij} + E_{ijk}$

Quadrado médio						
FV	Gl	FDN	FDA	Celulose	Hemicelulose	Lignina
Bloco/Amb	4	1,20	3,02	2,95	0,11	0,39
Híbridos	4	22,98NS	12,54NS	27,96NS	2,62NS	57,53**
Ambiente	1	35,80*	59,03*	55,95*	7,15NS	0,04NS
Hib./Amb.	4	4,74NS	5,42NS	6,06*	1,53NS	0,93NS
Resíduo	16	5,23	3,81	1,84	0,30	1,42
Média		89,86	86,62	66,66	3,16	19,95
CV		2,54	2,25	2,03	17,35	5,97

Híb./Amb.= interação genótipo ambiente; celulose, hemicelulose e lignina (%). ns, **, * = não significativo, significativo $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente pelo teste F.

ANEXO C - Análise de variância conjunta da composição lignocelulósica dos cinco híbridos de sorgo biomassa após o tratamento ácido seguido por básico.

Quadrado médio						
FV	Gl	FDN	FDA	Celulose	Hemicelulose	Lignina
Bloco/Amb	4	2,71	2,09	1,12	0,05	0,84
Híbridos	4	2,07NS	1,85NS	63,45*	2,17NS	48,08*
Ambiente	1	13,64NS	1,46NS	3,80NS	6,46NS	0,54NS
Hib./Amb.	4	1,93NS	1,58NS	3,52NS	3,67NS	4,92NS
Resíduo	16	1,88	1,43NS	3,87	0,20	2,66
Média		99,68	96,34	93,38	3,24	2,95
CV		1,37	1,24	2,10	13,78	55,29

Hib./Amb. = interação genótipo ambiente; celulose, hemicelulose e lignina (%). ^{ns, **, *} = não significativo, significativo p<0,01 e p<0,05, respectivamente pelo teste F.

ANEXO D - Análise de variância conjunta do rendimento de hidrólise e etanol (L ha⁻¹) da biomassa de sorgo após tratamento ácido e ácido seguido por base, dos cinco híbridos de sorgo biomassa.

Quadrado médio							
FV	Gl	g Etanol/ g Celulose	Rendimento de hidrólise SFS ác.	Rendimento de hidrólise SFS ác.+bs	L EtOH/ ha SFS ác.	L EtOH/ ha SFS ác.+bs	L EtOH/ ha SSF
Bloco/Amb	4						623246,5
Híbridos	4	0,01766 NS	208,66*	418,42**	1000218,32**	18229387,56NS	5874994,7 NS
Ambiente	1	0,00432 NS	28,94 NS	634,8**	2365066,09NS	5369976,74NS	3360682,5 NS
Hib./Amb.	4	0,00594*	29,66 NS	14,68 NS	46718,10NS	4887998,39**	2764369,2**
Resíduo	16	0,00095	53,54	6,20	119756,25	933751,86	268032,6
Média		0,29	69,14	25,73	3902,42	8962,28	8728,87
CV		10,60	10,58	9,67	8,86	10,78	5,93

Híbr./Amb. = interação genótipo ambiente; L ha⁻¹ = litros por hectare; SFS = sacarificação e fermentação separado; SSF = sacarificação e fermentação simultânea; ns, **, * = não significativo, significativo p<0,01 e p<0,05, respectivamente pelo teste F.

ANEXO E - Análise de variância de glicerol, ácido acético, hidroximetilfurfural e furfural (g L⁻¹) no hidrolisado ácido obtido da biomassa cultivada na safra 2015/2016.

FV	Gl	Quadrados médios			
		Glicerol	Ácido Acético	HMF	Furfural
Bloco/Amb	4	0,11	0,17	861910,64	3600,85
Híbridos	4	0,31 ^{NS}	0,11 ^{NS}	1151240,12 ^{NS}	4096,02 ^{NS}
Ambiente	1	1,11*	0,56 ^{NS}	7602767,62*	62339,27*
Hib./Amb.	4	0,54**	0,14 ^{NS}	806009,92 ^{NS}	2159,90 ^{NS}
Resíduo	16	0,04	0,10	988892,45	1810,90
Média		1,21	5,42	0,0024	0,00041
CV		18,07	6,00	40,04	10,35

HMF= hidroximetilfurfural; ns, **, * = não significativo, significativo p<0,01 e p<0,05, respectivamente pelo teste F.